

Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Straße 1, 30625 Hannover

Adapter zum Ankoppeln einer an einer
Zelloberfläche anzukoppelnden Substanz

Die Erfindung betrifft Adapter zum Ankoppeln einer an einer Zelloberfläche anzukoppelnden Substanz. Die Erfindung ermöglicht es, auch solche Substanzen an die Oberfläche einer Zelle anzukoppeln, die für eine Ankopplung normalerweise, d.h. ohne den Adapter, eine besondere

5 Oberflächenstruktur auf der Zelloberfläche (gewöhnlich ein Rezeptor) benötigen. Insbesondere betrifft die Erfindung Adapter zum Ankoppeln eines adenoviralen Fiberknob-Proteins an eine Zelloberfläche, sowie für diese Adapter codierende Nucleinsäuren, Viren und Verfahren zu ihrer Verwendung.

Die Erfindung betrifft auch Substanzen und Verfahren zum Vermitteln

10 und/oder Verbessern des Ankoppelns von Substanzen wie Adenovirus-Partikel an eine Zelloberfläche, die wenig oder gar keinen Coxsackie Adenovirus-Rezeptor enthält.

Zum Transfer heterologer Nucleinsäuren in eukaryontische Zellen, insbesondere Säugerzellen, werden häufig transgene Adenoviren verwendet. Diese tragen auf der Oberfläche des Virus-Partikels ein Fiberknob genanntes Protein, dass von einem auf der Oberfläche der zu behandelnden Zelle
5 (Zielzelle) angeordneten Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR; Bergelson, J.M. et al., Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5; Science 275 (1997), 1320-1323) genannten Rezeptorprotein erkannt und gebunden werden kann. Die Bindung des Fiberknob-Proteins an CAR gilt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt des
10 adenoviralen Infektionsprozesses. Es wird angenommen, dass nach dem Binden des Coxsackie Adenovirus Rezeptors an das Fiberknob-Protein und dem damit einhergehenden Ankoppeln des Virus-Partikels an der Zelloberfläche ein weiteres Adenovirus-Hüllprotein, das Pentonprotein, an einen Bestandteil der Zelloberfläche bindet, nämlich an eines oder mehrere
15 Integrine, wodurch eine Endocytose des Virus-Partikels in die Zielzelle ausgelöst wird.

Die Abhängigkeit von Adenoviren von dem Vorhandensein des Coxsackie Adenovirus Rezeptors auf der Oberfläche der Zielzelle schränkt die Verwendbarkeit von Adenoviren zum Transfer heterologer Nucleinsäuren in
20 eukaryontische Zellen ein (Kim, M., et al., The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumor cells; Eur. J. Cancer 38 (2002), 1917-1926). Zudem hat sich herausgestellt, dass die Expression von CAR abhängig ist vom Differenzierungsgrad einer Zelle (Walters, R., et al., Adenovirus fiber
25 disrupts CAR mediated intercellular adhesion allowing virus escape; Cell 110 (2002), 789-799). Dementsprechend ist die mit Adenoviren bisher erreichbare Transferrate heterologer Nucleinsäuren in Tumorzellen unbefriedigend niedrig.

Es ist daher versucht worden, den für die CAR-Erkennung maßgeblichen Abschnitt des Fiberknob-Proteins zu verändern, um den Viren ein Anbinden
30 an andere Bestandteile der Zelloberfläche als lediglich den Coxsackie Adenovirus Rezeptor zu ermöglichen und somit den Tropismus der Viren zu

verändern. Dieser Ansatz ist jedoch sehr aufwendig, da er eine Veränderung des Virengenoms erforderlich macht. Zudem ist die Kapazität des Fibrknob-Proteins für genetische Veränderungen sehr begrenzt (Suzuki, K., et al, A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic activity, Clin. Cancer Res. 7 (2001), 120-126).

Ebenfalls ist versucht worden, Fusionsproteine herzustellen, die die für die Fibrknobprotein-Erkennung verantwortliche extrazelluläre Domäne des Coxsackie Adenovirus Rezeptors und einen Ligandenabschnitt zur Erkennung durch einen auf der Oberfläche der Zielzelle exprimierten Rezeptor (Zielrezeptor) umfassen (Pereboev, A.V., et al., Coxsackievirus-adenovirus receptor genetically fused to anti-human CD40 scFv enhances adenoviral transduction of dendritic cells, Gene Ther. 9 (2002), 1189-1193). Dieser Ansatz erlaubt es, Zellen mit Adenoviren zu infizieren, die keinen oder nur in geringem Ausmaß den Coxsackie Adenovirus Rezeptor exprimieren, jedoch zumindest einen anderen Rezeptor exprimieren. Nachteilig ist jedoch, dass mit diesem Ansatz für jeden Zielrezeptor ein neues Fusionsprotein erzeugt werden muss, und dass die Infektion auf solche Zielzellen beschränkt bleibt, die den Zielrezeptor exprimieren (Curiel, D.T., Considerations and challenges for the achievement of targeted gene delivery, Gene Ther. 6 (1999), 1497-1498). Dies schränkt die Verwendbarkeit der Fusionsproteine insbesondere zur Infektion und Behandlung von Tumoren ein. Im Laufe ihrer Entwicklung werden Tumorzellen zunehmend genetisch instabil und ändern das Muster der von ihnen exprimierten Rezeptoren; dementsprechend kann jeder Tumorknoten über ein eigenes Spektrum an Zelloberflächenrezeptoren verfügen. Zur Tumorbehandlung wäre es deshalb erforderlich, zunächst die von allen Tumorzellen exprimierten Rezeptoren zu bestimmen, um anschließend entsprechende Fusionsproteine herzustellen.

Aus der Veröffentlichung von Gratton et al., Nature Medicine 2003, 357-362, ist ein Verfahren zum Erhöhen eines Adenovirus-vermittelten Gentransfers bekannt. Dabei werden Adenoviren mit hohen Konzentrationen (0,05 bis 5 mM) der dritten α -Helix der Antp-Homöodomäne vorinkubiert und

anschließend verdünnt zu den zu transduzierenden Zellen zugegeben. Bei dieser Behandlung wurde eine verbesserte Transduktion von CAR-freien COS-7-Zellen beobachtet. Weder bei Vorinkubation der COS-7-Zellen mit der dritten α -Helix der Antp-Homöodomäne und anschließender Zugabe des Adenovirus noch bei Vorinkubation der COS-7-Zellen mit Adenovirus und anschließender Zugabe der dritten α -Helix der Antp-Homöodomäne wurde eine signifikante Verbesserung der Transduktionsleistung beobachtet. Nachteilig an dem von Gratton et al. beschriebenen Behandlungsverfahren ist, dass die zur Transduktion vorgesehenen Adenoviren mit sehr hohen Konzentrationen der dritten α -Helix der Antp-Homöodomäne vorbehandelt werden müssen. Dadurch wird keine dauerhaft verbesserte Transduktionsleistung der verwendeten Adenoviren erreicht, stattdessen ist die Transduktionsleistung nur der vorbehandelten Viren verbessert. Insbesondere für gentherapeutische Zwecke nachteilig ist, dass Zellen, die mit einem gemäß Gratton et al. vorbehandelten Adenovirus infiziert wurden, keine Adenoviren hervorbringen können, die eine vergleichbar verbesserte Transduktionsleistung besitzen. Hierzu müssten die Zellen auch die dritte α -Helix der Antp-Homöodomäne in den von Gratton et al. beschriebenen hohen Konzentrationen exprimieren können, was jedoch physiologisch nicht erreichbar ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, den oben beschriebenen Nachteilen abzuhelpen und Mittel und Verfahren anzugeben, um auf möglichst einfache Weise das Spektrum der von Adenoviren infizierbaren Zellen (Zielzellen) zu erweitern. Vorteilhafterweise sollte die Infektion auch solcher Zielzellen mit einer annehmbaren oder guten Rate ermöglicht werden, die keinen oder nur in einem geringen Maße einen Coxsackie Adenovirus Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Mittel und Verfahren sollten nicht nur im Rahmen der Forschung, sondern ferner vorzugsweise auch therapeutisch, insbesondere gentherapeutisch wie beispielsweise zur Tumorbehandlung, und/oder nicht-therapeutisch, insbesondere zur Infektion von Zellkulturen, verwendbar sein.

Darüber hinaus besteht auch allgemein ein Bedarf, eine Substanz auf möglichst einfache Weise an die Oberfläche einer Zielzelle ankoppeln zu können, wobei die Zielzelle aus einem möglichst großen Spektrum verschiedener Zelltypen auswählbar sein soll.

5 Erfindungsgemäß wird deshalb ein Adapter zum Ankoppeln einer an einer Zelloberfläche anzukoppelnden Substanz angegeben, umfassend:

a) einen Abschnitt zum Erkennen der und Binden an die anzukoppelnde Substanz, und

10 b) einen rekombinanten Abschnitt zum Anordnen des Adapters an der Zelloberfläche mit einer Affinität für eine oder mehrere negativ geladene Zelloberflächenstrukturen.

Ein erfindungsgemäßer Adapter kann gleichzeitig die anzukoppelnde Substanz erkennen und an sie binden, und gegebenenfalls durch Vermittlung weiterer Strukturen und Elemente der Zelloberfläche, insbesondere durch
15 Vermittlung weit verbreiteter Rezeptoren, an der Zelloberfläche angeordnet werden. So kann auf vorteilhafte Weise weitgehend vermieden werden, für jeden Zelltyp einer ausgewählten Zielzelle ein an dessen spezifisches Rezeptor-Expressionsmuster angepasstes Fusionsprotein zu erzeugen.

Im Rahmen dieser Erfindung wird unter "Erkennen" die Fähigkeit des Adapters
20 verstanden, mit einer im Schnitt höheren Affinität an die anzukoppelnde Substanz (insbesondere an das adenovirale Fiberknob-Protein) als an ein zufälliges anderes Protein zu binden. Das Erkennen und Binden des erfindungsgemäßen Adapters an die anzukoppelnde Substanz kann im Allgemeinen als Ligand-Rezeptor-Interaktion betrachtet werden, ist aber nicht
25 auf einen solchen Mechanismus beschränkt.

Der Abschnitt b) des erfindungsgemäßen Adapters ermöglicht das Anordnen des Adapters an der Oberfläche der Zielzelle. Unter einem Anordnen des

Adapters an der Oberfläche der Zielzelle wird dabei ein Verbinden der äußeren Zelloberfläche mit dem Adapter verstanden, wobei die Verbindung nicht lediglich eine zufällige und flüchtige ist. Stattdessen besitzt der erfindungsgemäße Adapter eine hohe Affinität zu der Zelloberfläche, insbesondere zu einigen außen auf der Zelloberfläche befindlichen Zelloberflächen-Elementen wie Proteinen und Kohlenhydraten. Der Adapter bleibt auch eine Zeit lang auf der Zelloberfläche außen angeordnet und wird nicht sofort in die Zielzelle internalisiert, und/oder der Adapter bleibt im Extrazellularraum für ein Erkennen und Binden der anzukoppelnden Substanz verfügbar. Vorzugsweise besitzt der Adapter eine lange Halbwertszeit der Mediumverfügbarkeit, so dass die Internalisierungsgeschwindigkeit nicht mehr als 5 pmol Adapter/h, vorzugsweise nicht mehr als 3 pmol Adapter/h beträgt (unter folgenden Assaybedingungen: 1×10^6 Zielzellen in 3 ml DMEM/10% FCS).

Das Anordnen an der Zelloberfläche wird vorzugsweise durch Ankoppeln des erfindungsgemäßen Adapters an Zelloberflächen-Elemente bewirkt, die bei verschiedenen Zelltypen verbreitet oder ubiquitär sind. Insbesondere können die Zelloberflächen-Elemente Rezeptoren sein. Gemäß ersten Untersuchungen haben die negativ geladenen Elemente der Zelloberfläche, an die ein erfindungsgemäßer Adapter vermutlich bindet, keine Signalweiterleitungsfunktion.

In bevorzugten Ausführungsformen hat der Abschnitt b) einen insgesamt basischen Charakter und/oder ist vorzugsweise positiv geladen. Peptide mit basischem Charakter und positiv geladene Peptide sind besonders gut zur dauerhaften Anordnung an Zellmembranen geeignet, ohne für diese Anordnung auf zelltypspezifische Elemente der Zelloberfläche angewiesen zu sein. Dabei können positiv geladene Peptide sich gut an negativ geladenen Strukturen der Zelloberfläche anlagern.

Vorteilhafterweise sind die Abschnitte a) und b) des Adapters miteinander kovalent verbunden, gegebenenfalls über einen verbindenden weiteren Abschnitt.

In bevorzugten Ausführungsformen ist der Adapter durch seinen Abschnitt a)
5 vorteilhafterweise eingerichtet zum Erkennen und Binden an ein Virus oder eine andere, vorzugsweise virus-artige Substanz, insbesondere an einen Adenovirus, aber auch mit Hilfe anderer, jeweils geeigneter Abschnitte a), an ein Cytomegalievirus (CMV), Herpes simplex-Virus (HSV), Reovirus und vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV). Vorzugsweise ist der Adapter,
10 insbesondere durch seinen Abschnitt a), eingerichtet zum Erkennen und Binden einer für die jeweilige anzukoppelnde Substanz (insbesondere für das jeweilige Virus) spezifischen Oberflächenstruktur (Linker) und ermöglicht es so, selektiv das Virus oder eine andere anzukoppelnde Substanz umfassend die jeweilige Oberflächenstruktur (Linker) auf der Zelloberfläche einer Zielzelle
15 anzuordnen. Der Ausdruck „spezifisch“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Linker die anzukoppelnde Substanz von anderen, üblicherweise bei Verabreichung der anzukoppelnden Substanz an die Zielzelle ebenfalls vorkommenden anderen Substanzen zumindest so gut unterscheidbar macht, dass der Adapter unter diesen Bedingungen hauptsächlich die anzukoppelnde
20 Substanz und nicht hauptsächlich eine der anderen Substanzen erkennt und bindet.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst der Abschnitt a) einen Abschnitt zum Erkennen des und Binden an das adenovirale Fiberknob-Protein. Ein entsprechender Adapter kann gleichzeitig an ein herkömmliches
25 adenovirales Fiberknob-Protein ankoppeln und durch Vermittlung weiterer Strukturen und Elemente der Zelloberfläche, insbesondere durch Vermittlung weit verbreiteter Rezeptoren, oder ohne Vermittlung weiterer Elemente der Zelloberfläche an der Zelloberfläche angeordnet werden. So kann auf vorteilhafte Weise vermieden werden, zum Erweitern des Spektrums der von
30 Adenoviren infizierbaren Zellen die Adenoviren selbst genetisch verändern zu müssen; stattdessen können herkömmliche Adenoviren auch zum Infizieren

bisher nicht oder nur schwer infizierbarer Zielzellen verwendet werden. Darüber hinaus umgeht die Erfindung durch Angeben des erfindungsgemäßen (rekombinanten) Adapters auch für viele Zelltypen die Notwendigkeit, für jeden zu infizierenden Zelltyp ein an dessen natives Rezeptor-Expressionsmuster
5 angepasstes Fusionsprotein erzeugen zu müssen.

Besonders bevorzugt ist es, wenn der Abschnitt a) einen für die Erkennung des Fiberknob-Proteins funktionsfähigen Teil der extrazellulären Domäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors (CAR) oder einen dazu funktionsgleichen Teil umfasst.

10 Der Abschnitt a) eines solchen Adapters enthält einen Teil der extrazellulären Domäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors (gegebenenfalls also auch die vollständige extrazelluläre Domäne) oder einen dazu funktionsgleichen Teil. Funktionsgleich ist dabei ein Abschnitt a), der ein adenovirales Fiberknob-Protein erkennen, daran binden und somit den erfindungsgemäßen Adapter
15 an das Fiberknob-Protein koppeln kann. Zur Auswahl des Abschnitts a) kann sich der Fachmann der bekannten Literatur betreffend den Aufbau und die Funktion des Cocksackie Adenovirus Rezeptors bedienen und entsprechend leicht eine Aminosäuresequenz finden, die zum Ankoppeln des Adapters an ein Fiberknob-Protein geeignet ist. Besonders bevorzugt als Abschnitt a) sind
20 die Aminosäuren 1-235 des Cocksackie Adenovirus Rezeptors (Pubmed Accession No.: NM 001338, alle folgenden Accession-Nummern ebenfalls aus Pubmed).

Ferner kann der Fachmann neben oder anstelle eines Teils der extrazellulären Domäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors in Abschnitt a) einen Teil
25 vorsehen, der zwar noch immer ein Ankoppeln des erfindungsgemäßen Adapters an das Fiberknob-Protein ermöglicht, jedoch nicht als solcher in der extrazellulären Domäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors enthalten ist. Insbesondere kann der Fachmann einzelne Aminosäuren der extrazellulären Domäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors weglassen, hinzufügen
30 und/oder durch andere Aminosäuren ersetzen, solange die Funktion des

Abschnitts a) erhalten bleibt, nämlich das Ankoppeln des erfindungsgemäßen Adapters an ein Fiberknob-Protein zu ermöglichen.

Mit dem erfindungsgemäßen Adapter ist es somit erstmals möglich, ohne detaillierte Vorkenntnisse über die von der Zielzelle exprimierten Rezeptoren
5 einen Adapter mit hoher Affinität zu einem adenoviralen Fiberknob-Protein an der Oberfläche einer Zielzelle anzuordnen und diese somit für ein Ankoppeln eines Adenovirus-Partikels an die Zielzelle empfänglich zu machen. Der erfindungsgemäße Adapter ermöglicht auf vorteilhafte Weise, einen hohen Anteil von epithelialen Zellen, Fibroblasten, neuronalen Zellen, dendritischen
10 Zellen, Osteoblasten und Myozyten sowie aus diesen Zelltypen hervorgegangene entartete Zellen mit Adenoviren zu infizieren.

Bevorzugt ist ein Adapter, dessen Abschnitt b) ausgewählt ist aus:

- einem Peptid von 6 oder mehr Aminosäuren Länge, von denen zumindest die Hälfte Guanidino- und/oder Amidinoseitenketten enthalten,
- 15 - einem Oligopeptid mit zumindest 6 Argininseitenketten,
- einem Peptid der Aminosäuresequenz entsprechend der basischen Region des HIV tat-Proteins,
- der dritten Helix eines Homöobox-Proteins, und
- einen die Verankerung an einer Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt
20 des Proteins VP22 des Herpes simplex-Virus.

Besonders bevorzugt sind dabei solche Adapter, deren Abschnitt b) ausgewählt ist aus:

- einem Peptid der Aminosäuresequenz entsprechend der basischen Region des HIV tat-Proteins,

- einen die Verankerung an einer Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt des Proteins VP22 des Herpes simplex-Virus.

Diese Adapter haben sich deutlich besser als Adapter mit den übrigen genannten Abschnitten b) in einer Vielzahl von Zelltypen als besonders
5 geeignet erwiesen zum Ankoppeln einer anzukoppelnden Substanz, insbesondere zum Ankoppeln eines Adenovirus (in diesem Fall umfasst der Abschnitt a) des Adapters vorzugsweise einen für die Erkennung des Fiberknob-Proteins funktionsfähigen Teil der extrazellulären Domäne des Coxsackie Adenovirus Rezeptors (CAR) oder einen dazu funktionsgleichen
10 Teil).

Zwar ist bereits zuvor untersucht worden, ob Peptide der bevorzugten kennzeichnenden Art geeignet sind für ein Anordnen auf der Oberfläche eukaryontischer Zellen. Es ist jedoch nicht bekannt gewesen, diese Peptide mit einem Abschnitt zum Erkennen und Binden einer anzukoppelnden
15 Substanz, insbesondere des adenoviralen Fiberknob-Proteins, zu versehen. Zudem wurde nunmehr gefunden, dass die genannten Peptide nicht nur zum Transport von Makromolekülen in Zellen geeignet sind, sondern auch (in Verbindung mit einem ein Adenovirus-Partikel erkennenden und bindenden Abschnitt a) eine für die Zwecke einer Infektion durch Adenoviren hinreichend
20 dauerhafte Anlagerung des erfindungsgemäßen Adapters an der Zelloberfläche einer Zielzelle bewirken können.

So offenbart die US 6,495,663 ein Transportpolymer aus 6 bis 25 Untereinheiten, von denen zumindest 50% eine Guanidino- oder Amidino-Seitenkette enthalten. Das Transportpolymer ist geeignet, ein daran
25 angehängtes Agens durch eine biologische Membran mit einer Rate zu transportieren, die größer ist als die des Agens als solchem. Zur Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Adapters wird sich der Fachmann daher zweckmäßigerweise an der genannten US-Patentschrift orientieren, insbesondere sind die darin als bevorzugt gekennzeichneten Ausführungs-
30 formen auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Als

besonders wertvoll hat sich dabei ein Abschnitt b) herausgestellt, der linear ist, 7 bis 20 Aminosäuren lang ist, und wobei jede bis auf höchstens eine der Aminosäuren eine Guanidino- oder Amidino-Seitenkette besitzt.

5 Ferner offenbart die US 6,316,003 ein Transport-Polypeptid zum intrazellulären Ausliefern von "Fracht"-Molekülen mit Hilfe des HIV tat-Proteins oder eines oder mehrerer seiner Abschnitte. Als besonders nützlich wird darin die basische Region des tat-Proteins beschrieben, worunter insbesondere der Abschnitt der Aminosäuren 49 bis 57 verstanden wird. Der Fachmann wird sich zum Ausgestalten des erfindungsgemäßen Adapters daher gegebenenfalls an dieser Patentschrift orientieren. Die darin als bevorzugt genannten Ausführungsbeispiele sind deshalb auch erfindungsgemäß zur Ausgestaltung des Abschnitts b) des erfindungsgemäßen Adapters besonders bevorzugt. Hierzu zählt insbesondere ein Peptid mit der Aminosäuresequenz RKKRRQRRR.

15 Daneben offenbart die US 5,888,762 die Verwendung der dritten Helix eines Homöobox-Peptids zum Einführen eines Makromoleküls in eine lebende Zelle. Diese Patentschrift wird der Fachmann dementsprechend heranziehen, wenn er einen erfindungsgemäßen Adapter gemäß der vierten der oben aufgezählten Möglichkeiten herstellen will. Insbesondere sind erfindungsgemäß auch die in der US 5,888,762 als bevorzugt beschriebenen Ausführungsformen bevorzugt. Als erfindungsgemäß besonders vorteilhaft herausgestellt hat sich eine Homöobox-Proteinfragment mit den Aminosäuren 43 bis 58 der Homöodomäne, insbesondere aus dem Antennapedia-Homöoboxprotein; ebenfalls bevorzugt sind die diesen entsprechenden
25 Abschnitte der Homöobox-Proteine von engrailed-1, engrailed-2, hoxa-5, hoxc-8 und fushi tarazu. Besonders bevorzugt umfasst der Abschnitt b) des erfindungsgemäßen Adapters ein Peptid mit der Aminosäuresequenz RQIKIWFQNRRMKWKK, also die Aminosäuresequenz der Aminosäuren 43-58 des Antennapedia Homeodomainproteins von Euprymna scolopes,
30 Accession No. AY 052758.

Schließlich offenbart die US 6,184,038 die Verwendung von VP22 des Herpes simplex-Virus und dessen Homologen als Transportprotein. Auf die Offenbarung dieser Patentschrift wird der Fachmann entsprechend zurückgreifen, wenn er einen erfindungsgemäßen Adapter gemäß der letzten
5 der oben aufgezählten Möglichkeiten herstellen will. Erfindungsgemäß besonders bevorzugt als Abschnitt b) des Adapters sind die 34 C-terminalen Aminosäuren des VP22-Proteins und entsprechende analoge und/oder homologe Peptide, soweit sie die Fähigkeit vermitteln, ein Protein an einer Zelloberfläche anzuordnen.

10 Insbesondere solche Adapter, bei deren Abschnitt b) die basische Region des HIV tat-Proteins und/oder einen die Verankerung an der Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt des VP22-Proteins des Herpes simplex-Virus bzw. einen Teil dieser Peptide umfasst, können an negativ geladene Elemente der Zelloberfläche von Zellen unterschiedlicher Genese anlagern und sind
15 besonders bevorzugt. Besonders gut gelingt die Anlagerung an die Zelloberfläche von Zellen epithelialen Ursprungs. Gemäß den bisherigen Untersuchungen gelingt die Anlagerung ebenfalls gut an die Zelloberflächen von Zellen, die stark zur Zelladhäsion neigen. Damit sind diese erfindungsgemäßen, besonders bevorzugten Adapter vorteilhaft geeignet zum
20 Herstellen eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Tumoren epithelialen Ursprungs und/oder zur Bekämpfung von Tumoren mit starker Neigung zur Zelladhäsion. Dies gilt insbesondere für epitheliale Karziome, Sarkome, Glioblastome und Astrozytome.

Besonders vorteilhaft an den erfindungsgemäßen Adaptern ist, insbesondere
25 solchen, bei deren Abschnitt b) die basische Region des HIV tat-Proteins und/oder einen die Verankerung an der Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt des VP22-Proteins des Herpes simplex-Virus bzw. einen Teil dieser Peptide umfasst, dass sie bereits in verhältnismäßig geringen Konzentrationen eine deutliche Verbesserung der Transduktionsleistung beispielsweise eines
30 Adenovirus für eine Vielzahl von Zelltypen erreicht werden kann. Besonders bevorzugt wird daher der erfindungsgemäße Adapter mit einer nicht mehr als

5000fach höheren Konzentration als die anzukoppelnde Substanz eingesetzt, bezogen auf die Molarität des Linkers der anzukoppelnden Substanz. Soll beispielsweise der Adapter verwendet werden zum Ankoppeln eines Adenovirus (oder entsprechend einer Substanz mit einem Fiberknob-Protein auf ihrer Oberfläche), so werden Adapter und Adenovirus gemischt, wobei das molare Verhältnis von Adaptermolekülen zu Fiberknob-Proteinen nicht mehr als 5000 (Adapter) zu 1 (Fiberknob-Protein) beträgt. Gemäß den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wird ein erheblich höherer Überschuß an Hilfssubstanzen benötigt. So setzen beispielsweise Gratton et al. das von ihnen verwendete AntP-Protein in einem Verhältnis von zumindest $2,5 \times 10^7$ (AntP) zu 1 (Fiberknob) ein, um gerade noch nachweisbare minimale Effekte zu erzielen; gute Effekte werden bei dem Verfahren gemäß Gratton et al. erst bei einem Verhältnis von $2,5 \times 10^9$ zu 1 erreicht.

Üblicherweise besitzt die anzukoppelnde Substanz einen Linker, d.h. einen Bestandteil ihrer Oberfläche (wie beispielsweise ein Fiberknob-Protein), der vom Abschnitt a) des Adapters erkannt wird. Besonders bevorzugt beträgt dann das Verhältnis von Adapter zu Linker zumindest 10:1 bis 1500:1, insbesondere bevorzugt 100:1 bis 500:1. Soll beispielsweise ein Adenovirus auf einer Zielzelle angeordnet werden, insbesondere zum Transduzieren der Zielzelle, so beträgt die Konzentration an erfindungsgemäßigem Adapter (insbesondere einem Adapter, bei dem Abschnitt b) die basische Region des HIV tat-Proteins und/oder einen die Verankerung an der Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt des VP22-Proteins des Herpes simplex-Virus bzw. einen Teil dieser Peptide umfasst) vorzugsweise 0,1 bis 100 nM, besonders bevorzugt 0,5 bis 50 nM, und besonders bevorzugt 1 bis 10 nM. Bereits derart geringe Konzentrationen eines erfindungsgemäßen Adapters reichen aus, um eine deutliche Verbesserung der Transduktionsleistung eines Adenovirus bei einer Vielzahl CAR-freier Zelltypen zu erzielen.

Es hat sich ferner als nützlich herausgestellt, wenn der erfindungsgemäße Adapter zusätzlich einen Oligomerisierungsabschnitt zum Bilden von Di-, Tri- und/oder Oligomeren des Adapters umfasst. Durch das Vorsehen des

Oligomerisierungsabschnitts kann die Affinität des erfindungsgemäßen Adapters zum adenoviralen Fiberknob-Protein bzw. der anzukoppelnden Substanz auf einfache Weise dauerhaft gesteigert werden. Als Oligomerisierungsabschnitt ist insbesondere die Oligomerisierungsdomäne des GCN4-Proteins und/oder Leucin-Zipper-Domänen bevorzugt.

Besonders gut gelang die Herstellung des erfindungsgemäßen Adapters, wenn dieser ferner eine Leadersequenz umfasst, um die Synthese des Adapters in das rauhe endoplasmatische Retikulum und vorzugsweise auch in den Extrazellularraum zu bewirken. Auf diese Weise kann der erfindungsgemäße Adapter leicht aus einer diesen herstellenden eukaryontischen Zelle ausgeschleust werden. Als Leadersequenz besonders bevorzugt ist die natürliche Leadersequenz des Coxsackie Adenovirus Rezeptors. Zweckmäßigerweise besitzt der erfindungsgemäße Adapter keine Transmembrandomäne des Coxsackie Adenovirus Rezeptors. Durch das Fehlen dieser Transmembrandomäne wird das Abgeben des erfindungsgemäßen Adapters aus einer exprimierenden eukaryontischen Zelle in den Extrazellularraum zusätzlich vereinfacht.

Erfindungsgemäß wird weiter eine Nucleinsäure angegeben mit einem Abschnitt, der für einen Adapter nach einer der zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Arten codiert. Eine solche Nucleinsäure vereinfacht das Herstellen des Adapters in einer Wirts- oder Produktionszelle.

Die für den Adapter kodierende Nucleinsäure kann insbesondere Teil eines Virusgenoms sein und darin vorzugsweise in Form einer Expressionseinheit vorliegen. Dementsprechend wird erfindungsgemäß auch ein rekombinantes Virus angegeben mit gegenüber der Wildtypform verbesserten Ausbreitungseigenschaften in einer Kultur eukariontischer Zellen, insbesondere menschlicher und/oder tierischer Zellen. Das Virus kann insbesondere auch gegenüber seiner Wildtypform verbesserte Tumor-Lyseeigenschaften besitzen.

Das Virus zum Expressieren eines Adapters nach einer der zuvor beschriebenen erfindungsgemäßen Arten besitzt in bevorzugten Ausführungsformen zumindest in einem Stadium seiner Vermehrung eine Virushülle, und es enthält:

- 5 - eine Nucleinsäure wie soeben beschrieben, und
- einen Nucleinsäure-Abschnitt zur Expression eines Proteins der Virus-Hülle, an das der Abschnitt a) des Adapters ankoppeln kann.

Dabei wird unter einem Virus eine nucleinsäurehaltige Einheit verstanden, deren Nucleinsäure in einer Wirtszelle vermehrbar ist und wobei die
10 Nucleinsäure in ein gegebenenfalls aus mehreren Einheiten zusammengesetztes Partikel (Virus-Partikel) verpackt werden kann, und wobei die gegebenenfalls in ein Virus-Partikel verpackte Nucleinsäure aus der Wirtszelle (beispielsweise beim Tod der Wirtszelle) freigesetzt werden kann, um in eine weitere Wirtszelle einzudringen. Ein Beispiel für ein erfindungsgemäßes Virus
15 ist ein von einem Adenovirus des Typs 2 und/oder 5 abgeleitetes Virus mit einer Nucleinsäure zur Expression eines erfindungsgemäßen Adapters, dessen Abschnitt a) einen Abschnitt zum Erkennen des und Binden an das adenoviral Fiberknob-Protein enthält.

Unter einem Adenovirus-Partikel (in dieser Beschreibung gelegentlich auch
20 als "Virus-Partikel" abgekürzt) wird jeder Körper verstanden, der eine Nucleinsäure einschließt oder auf andere Weise mit ihr gekoppelt ist, die, wenn sie exprimiert wird, seine eigene Herstellung bewirkt, und zumindest ein adenovirales Fiberknob-Protein besitzt. Insbesondere sind die Virus-Partikel herkömmlicher Adenoviren Adenovirus-Partikel im Sinne der Erfindung. Es ist
25 ferner besonders bevorzugt, wenn das Adenovirus-Partikel ein Virus-Partikel eines erfindungsgemäßen Virus wie soeben beschrieben ist.

Die erfindungsgemäßen Viren ermöglichen auf vorteilhaft einfache Weise, in einer Wirtszelle sowohl einen erfindungsgemäßen Adapter herzustellen, als

auch eine Virus-Hülle bzw. ein Virus-Partikel herzustellen, das von dem erfindungsgemäßen Adapter erkannt und gebunden werden kann. Das erfindungsgemäße Virus kann sich dann in einer Kultur von Zielzellen auszubreiten, ohne dass diese Kultur nativ über besondere Rezeptoren zum Ankoppeln des Virus an die Zielzellen verfügen müsste. Sobald die erste Zielzelle infiziert ist und die Herstellung des erfindungsgemäßen Adapters eingesetzt hat, wird dieser aus der ersten Zielzelle freigesetzt und auf der Zelloberfläche weiterer Zielzellen angeordnet. Aus der ersten Zielzelle freigesetzte erfindungsgemäße Viren können dann an die so veränderten weiteren Zielzellen über die erfindungsgemäßen Adapter ankoppeln und diese weiteren Zielzellen infizieren.

Entsprechend besonders bevorzugt ist ein Virus, dessen Vermehrung gewebespezifisch reguliert ist. Auf diese Weise kann die Ausbreitung der erfindungsgemäßen Viren im wesentlichen auf bestimmte Gewebe (Zielgewebe), beispielsweise Tumorgewebe, begrenzt werden. Bevorzugte gewebespezifisch regulierte Promotoren, die zur gewebespezifischen Regulierung der Virus-Vermehrung verwendet werden können, sind: Promotoren für den AFP-(Alphafetoprotein)-Tumormarker, für das prostata-spezifische Antigen (PSA), für die Proteinuntereinheit der Telomerase (hTERT), sowie Promotoren, die durch Transkriptionsfaktoren reguliert werden, insbesondere durch die Transkriptionsfaktoren myc, myb, E2F und solche Transkriptionsfaktoren, die infolge mitogener Signale aktiviert und/oder verstärkt exprimiert werden.

Gleichzeitig oder alternativ dazu ist ein Virus bevorzugt, dessen für den erfindungsgemäßen Adapter codierender Nucleinsäureabschnitt gewebespezifisch reguliert ist. Auf diese Weise kann das Expressieren des erfindungsgemäßen Adapters im wesentlichen auf ein Zielgewebe begrenzt werden. Zur gewebespezifischen Regulation können wiederum die im vorangegangenen Absatz beschriebenen Promotoren verwendet werden.

Ebenfalls bevorzugt sind solche Viren, die ferner eine Nucleinsäure umfassen, die für ein zelltoxisches Mittel codiert, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn die Nucleinsäure eingerichtet ist, das zelltoxische Mittel in gewebespezifischer Weise zu exprimieren. Die entsprechende Nucleinsäure
5 kann insbesondere ein Abschnitt der Nucleinsäure sein, die den für den erfindungsgemäßen Adapter codierenden Abschnitt enthält. Bevorzugte zelltoxische Mittel, für die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure codieren kann, sind die Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase und die Cytosindeaminase. Insbesondere ist es bevorzugt, wenn das Virus onkolytisch
10 ist.

Wenn der erfindungsgemäße Adapter eine höhere Affinität zum Virus-Partikel, insbesondere zum Fiberknob-Protein, als zur Zelloberfläche bzw. zu dem/den die Anordnung des Adapters an der Zelloberfläche vermittelnden Elementen der Zelloberfläche besitzt, wird ein Virus-Partikel gewöhnlich zunächst mit
15 mehreren erfindungsgemäßen Adaptern ummantelt, bevor es an einer Zelloberfläche angelagert wird.

Zudem wird erfindungsgemäß die Verwendung eines erfindungsgemäßen Adapters zum nicht-therapeutischen Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz, insbesondere eines Adenovirus-Partikels, an eine
20 Zelloberfläche gelehrt. Wie oben beschrieben ermöglicht es der erfindungsgemäße Adapter, im wesentlichen unabhängig von nativen Rezeptoren oder unter Vermittlung verbreiteter Zelloberflächen-Elemente einer Wirtszelle diese für eine Infektion mit Adenovirus-Partikeln oder für ein Ankoppeln einer anderen anzukoppelnden Substanz empfänglich zu machen.
25 Auf diese Weise lässt sich die Transformationseffizienz beispielsweise bei der Infektion einer eukaryontischen Zellkultur vorteilhaft einfach verbessern.

Die erfindungsgemäßen Adapter eignen sich besonders gut, die Infektionsrate solider Tumore mit Adenoviren zu erhöhen. Auf diese Weise kann der zur Infektion benötigte Virus-Titer verringert werden, wodurch im Tiermodell oder

auch beim Menschen die Lebertoxizität eines Adenoviren enthaltenden Medikaments oder Präparats verringert werden kann.

Dementsprechend wird erfindungsgemäß auch ein Verfahren angegeben zum nicht-therapeutischen Ankoppeln einer Substanz, insbesondere eines
5 Adenovirus-Partikels, an eine Zelloberfläche, umfassend die Schritte:

- a) Exponieren der anzukoppelnden Substanz (insbesondere des Adenovirus-Partikels) gegen einen erfindungsgemäßen Adapter, um die Substanz mit dem Adapter zu versehen, und
- b) Exponieren der Zelloberfläche gegen die mit dem Adapter versehene,
10 anzukoppelnde Substanz.

In Schritt a) kann insbesondere ein Adenovirus-Partikel mit dem erfindungsgemäßen Adapter versehen werden. Dabei ist es vorteilhaft, das Virus-Partikel mehreren erfindungsgemäßen Adaptern auszusetzen, um das Virus-Partikel mit dem erfindungsgemäßen Adapter zu ummanteln. Im zweiten
15 Schritt wird die Zielzelle einer Dosis der so behandelten Adenovirus-Partikeln (zumindest 1 Partikel) ausgesetzt, um ein Ankoppeln zumindest eines Partikels an die Zelloberfläche über den erfindungsgemäßen Adapter zu ermöglichen. Auf diese Weise wird erstmals eine effektive Ankopplung von Adenoviren an Zielzellen ermöglicht, die keinen oder nur eine geringe Menge
20 des Coxsackie Adenovirus Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und entsprechend bisher schlecht mit Adenoviren infizierbar waren. Beispielsweise ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erstmals möglich, mit zufriedenstellender Effizienz Stroma-Fibroblasten zu infizieren.

In einem therapeutischen Verfahren kann ein erfindungsgemäßer Adapter
25 ebenfalls eingesetzt werden zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz, insbesondere eines Adenovirus-Partikels, an eine Zelloberfläche. Letzteres ist insbesondere im Rahmen von Gentherapie-Verfahren mit Adenoviren und/oder daraus abgeleiteten Viren, beispielsweise

zur Tumorbekämpfung, von Vorteil. In einem therapeutischen Verfahren ist es ebenfalls bevorzugt, zunächst ein Virus-Partikel mit dem erfindungsgemäßen Adapter zu versehen (insbesondere zu ummanteln), und anschließend eine Zielzelle gegen das so behandelte Virus-Partikel zu exponieren.

- 5 Es ist daher bevorzugt, eine erfindungsgemäße Nucleinsäure und/oder ein erfindungsgemäßes Virus zu verwenden zum Herstellen eines Arzneimittels zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz, insbesondere eines Adenovirus-Partikels, an eine Zelloberfläche, wobei die Verwendung eines erfindungsgemäßen Virus besonders bevorzugt ist. Mit
10 einem solchen Arzneimittel lassen sich die mit der soeben beschriebenen therapeutischen Verwendung der erfindungsgemäßen Adapter und Viren erzielbaren Vorteile besonders einfach verwirklichen. Insbesondere eröffnet ein entsprechendes Arzneimittel erstmals die Möglichkeit, auch bisher nicht oder nur schwer mit Adenoviren infizierbare Zellen, insbesondere Tumorzellen
15 und Stroma-Fibroblastenzellen, in einem für therapeutische Zwecke ausreichendem Maße zu infizieren. Fibroblastenzellen besitzen eine wesentliche Rolle für die Ernährung wachsender Tumore, das Verbessern ihrer Infizierbarkeit stellt daher einen erheblichen Fortschritt in der Tumor-Therapie dar.

Ein erfindungsgemäßes Arzneimittel zum Vermitteln und/oder Verbessern des
20 Ankoppelns einer Substanz (insbesondere eines Adenovirus-Partikels) an eine Zelloberfläche umfasst deshalb

- einen erfindungsgemäßen Adapter und/oder ein erfindungsgemäßes Virus, und
 - einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.
- 25 Zweckmäßigerweise kann es sich bei dem Arzneimittel um ein aus zwei getrennten Teilen bestehendes Präparat handeln, dessen einer Teil einen erfindungsgemäßen Adapter und dessen anderer Teil ein erfindungsgemäßes Virus umfasst. Soll das Arzneimittel zum Vermitteln und/oder Verbessern des

Ankoppeln eines Adenovirus-Partikels dienen, so ist es bevorzugt, vor dem Verabreichen an einen Patienten die beiden Teile des Arzneimittels miteinander zu mischen, um die adenoviralen Fiberknob-Proteine mit dem erfindungsgemäßen Adapter zu koppeln; die so entstehenden
5 adapterbeladenen Viren sind besonders geeignet zum Infizieren im wesentlichen beliebiger Gewebe, insbesondere auch solcher, die keinen oder nur eine geringe Menge des Cocksackie Adenovirus Rezeptors exprimieren.

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen sind insbesondere einsetzbar im Zusammenhang mit Zellen menschlichen
10 Ursprungs. Die erfindungsgemäßen Adapter sind jedoch auch geeignet, das Anordnen einer Substanz, beispielsweise eines adenoviralen Fiberknob-Proteins (einschließlich eines dieses Protein umfassenden Virus-Partikels), an der Oberfläche einer Zielzelle sonstigen Ursprungs zu bewirken, soweit der Abschnitt b) des Adapters so ausgewählt ist, dass dieser an der Oberfläche
15 der Zielzelle angeordnet werden kann. Eine Zielzelle sonstigen Ursprungs kann insbesondere eine Zielzelle aus bzw. in einem Affen oder Hund sein.

Die erfindungsgemäßen Adapter und Viren sind ebenfalls vorteilhaft geeignet, ganze Gewebe und zumindest im Einzelfall auch ganze Organismen, insbesondere Tiere, zu transduzieren. Sie sind deshalb vorteilhaft verwendbar
20 in gentherapeutischen Verfahren an Mensch und Tier, insbesondere Maus, Ratte, Hund, Schaf, Ziege, Schwein, Rind, Kaninchen, und -zur Herstellung eines gentechnisch veränderten Tieres, insbesondere Maus, Ratte, Hund, Schaf, Ziege, Schwein, Rind, Kaninchen, wobei die Veränderung auch die Keimbahn erfassen kann.

25 Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Beispiele und der Figuren näher erläutert, wobei die Figuren und Beispiele den Gegenstand der Erfindung nicht begrenzen sollen. Es stellen dar:

Fig. 1 schematischer Aufbau erfindungsgemäßer Adapter;

- Fig. 2 Photographien von Adenovirus-infizierten Zellkulturen, wobei das Adenovirus mit einem erfindungsgemäßen Adapter ummantelt worden ist;
- 5 Fig. 3 schematische Darstellung der Wirkungsweise erfindungsgemäßer Adapter;
- Fig. 4 weitere schematische Darstellung der Wirkungsweise erfindungsgemäßer Adapter,
- 10 Fig. 5 Vergleich der Verbesserung der Transduktionsleistung verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter für verschiedene Zelltypen,
- Fig. 6 weiterer Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter,
- 15 Fig. 7 Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener erfindungsgemäßer Adapter gegenüber Tumorzellen epithelialen Ursprungs,
- Fig. 8 Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener erfindungsgemäßer Adapter gegenüber Zellen nicht-epithelialen Ursprungs,
- 20 Fig. 9 Ergebnisse einer Untersuchung zum Nachweisen der Möglichkeit, konditionell replizierende Viren zur Transduktion entsprechender Zellen zu verwenden,
- Fig. 10 Ergebnisse einer Untersuchung zum Bestimmen der Dauerhaftigkeit einer Beladung von Adenoviren mit verschiedenen erfindungsgemäßen Adaptern,

Fig. 11 Vergleich des Einflusses des pH-Wertes des Kultivierungsmediums auf die Transduktionseffizienz verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter,

5 Fig. 12 Darstellung des Einflusses einer gegenüber der Verabreichung eines erfindungsgemäßen Adapters verzögerten Verabreichung einer anzukoppelnden Substanz an verschiedene Zielzellen.

Fig. 1 zeigt schematisch den Aufbau von vier erfindungsgemäßen Adapter-Proteinen in ihrer Primärstruktur. Alle Adapter besitzen am N-Terminus eine Leadersequenz des Coxsackie Adenovirus-Rezeptors. Die Leadersequenz bewirkt die Synthese des erfindungsgemäßen Adapters in das endoplasmatische Retikulum einer den Adapter exprimierenden Wirtszelle. An die Leadersequenz schließt sich die Extrazellulardomäne des Coxsackie Adenovirus-Rezeptors an, sie entspricht Abschnitt a) des erfindungsgemäßen Adapters. Auf die Extrazellulardomäne folgt in C-terminaler Richtung der Abschnitt b) des erfindungsgemäßen Adapters. Dieser ist in den vier dargestellten Adapter (von oben nach unten) jeweils ausgeführt als ein die Verankerung an einer Zelloberfläche vermittelnder Abschnitt des Proteins VP22 des Herpes simplex-Virus, die basische Region des HIV tat-Proteins, ein Oligoargininpeptid mit 9 Argininresten und die dritte Helix eines Homöobox-Proteins. Zwischen den Abschnitten a) und b) kann, wie dargestellt, eine die Dimerisierung fördernde Domäne (hier: der Leucin-Zipper aus GCN4) angeordnet sein; sie kann die Affinität des erfindungsgemäßen Adapters zum Fiberknob-Protein erhöhen.

Fig. 2 zeigt Photographien von Zellkulturen von NIH3T3-Zellen, die mit Adenoviren unter Verwendung erfindungsgemäßer Vektoren infiziert worden sind. Als Kontrolle (oben links dargestellt) diente eine Kultur von NIH3T3-Zellen, die gegen Adenoviren ohne erfindungsgemäßen Vektor exponiert wurde. Die erfindungsgemäßen Adapter wurden vor der Infektion der NIH3T3-Zellen in 293-Zellen exprimiert und in den Zellüberstand ausgeschieden. Der Zellüberstand wurde 36 Stunden nach der Transfektion der 293-Zellen mit

einer für den jeweiligen erfindungsgemäßen Adapter codierenden Nucleinsäure abgenommen und mit LacZ-codierenden Adenoviren vermischt. Die so mit einem jeweiligen erfindungsgemäßen Adapter versehenen Adenoviren wurden zu einer Kultur NIH3T3-Zellen gegeben, um diese zu infizieren. Die multiplicity of infection (MOI) betrug 10. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturen durch Xgal-Blaufärbung auf β -Galactosidase-expression untersucht. Zellen, die mit einem Adenovirus infiziert waren, wurden dabei blau gefärbt. Die Infektion gelang am besten mit solchen erfindungsgemäßen Adapter, die entweder die basische Region des HIV tat-Proteins (oben rechts dargestellt, "CAR-Tat") oder ein die Verankerung an einer Zelloberfläche vermittelnder Abschnitt des Proteins VP22 des Herpes simplex-Virus (unten rechts dargestellt, "CAT-VP22") im Abschnitt b) besaßen. Aber auch ein erfindungsgemäßer Adapter mit der dritten Helix des AntP-Homöobox-Proteins im Abschnitt b) führte zu einer gegenüber der Kontrolle leicht verbesserten Infektionsrate (unten links dargestellt, "CAR-AntP").

Fig. 3 zeigt schematisch die Wirkungsweise erfindungsgemäßer Adapter. Adenovirus-Partikel können CAR-defiziente Zellen nicht oder nur schlecht infizieren (Darstellung oben links). Die Infektionsrate wird deutlich gesteigert, wenn die zu infizierende Zelle auf ihrer Zelloberfläche den Coxsackie Adenovirus-Rezeptor exprimiert (unten links dargestellt). Ein erfindungsgemäßer Adapter vermittelt die Anhaftung eines Adenovirus-Partikels an eine CAR-defiziente Zelle (Darstellung rechte Hälfte). Der erfindungsgemäße Adapter bindet dazu mit seinem Abschnitt a) an ein Fiberknob-Protein des Adenovirus-Partikels. Sein Abschnitt b) besitzt eine hohe Affinität zur Zelloberfläche der Zielzelle, insbesondere zu bei dem Zelltyp der Zielzelle weit verbreiteten Elementen der Zelloberfläche. Der erfindungsgemäße Adapter vermittelt den Kontakt zwischen der Zelloberfläche bzw. den Elementen der Zelloberfläche, zu denen der Adapter eine hohe Affinität besitzt, und dem Adenovirus-Partikel. Nach Herstellen des Kontakts kann das Adenovirus-Partikel internalisiert und die Infektion der Zielzelle vollzogen werden.

In Fig. 4 ist schematisch eine Zellkultur dargestellt, die teilweise mit Adenoviren infiziert ist (Zelle links außen und rechts Mitte), wobei die Adenoviren auch für einen erfindungsgemäßen Adapter codieren. Die infizierten Zellen exprimieren sowohl den erfindungsgemäßen Adapter und setzen ihn in den Extrazellularraum frei. Sie produzieren jedoch auch neue Adenovirus-Partikel; diese werden bei der Zellyse (unten Mitte dargestellt) freigesetzt und von im Extrazellularraum befindlichen erfindungsgemäßen Adapter teilweise ummantelt. Die so (zumindest teilweise) ummantelten Adenoviren können eine weitere Zelle infizieren (dargestellt links Mitte, oben Mitte und unten rechts), um dort sowohl den erfindungsgemäßen Adapter als auch neue Adenovirus-Partikel herstellen zu lassen. Die Infektion der Zellkultur breitet sich so selbständig aus.

Die Fig. 5 zeigt einen Vergleich der Verbesserung der Transduktionsleistung verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter für verschiedene Zelltypen. Dabei wurden 293-Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, die für die jeweils in den Teilfiguren angegebenen Adapterproteine codieren. 36 h nach der Transfektion der 293-Zellen wurde der Überstand dieser Zellkultur mit Adenoviren (Ad-LacZ) vermischt und in das Kultivierungsmedium der in den Teilfiguren jeweils angegebenen Zellkulturen gegeben. Nach 4 h wurde das Kultivierungsmedium gegen virusfreies Kultivierungsmedium ausgetauscht. Die Zellkulturen wurden weitere 48 h lang unter üblichen Kultivierungsbedingungen inkubiert. Die Transduktionsleistung und Infektiosität wurde durch β -Gal-Assay bestimmt. Es ist zu erkennen, dass die Transduktionsleistung bei allen untersuchten Zelltypen (RT-101, RKO, BNL, T36274, MCF-7, HT-1080, SAOS-2; SKLU_1) durch Verwendung der erfindungsgemäßen Adapter CARex-VP22 bzw. CARex-Tat verbessert wird, da die Expression des Reportergens wenigstens um den Faktor 5 im Vergleich zur adapterfreien Infektion gesteigert wird. In einigen Zelltypen (SAOS-2, SKLU_1) konnte auch durch Verwendung des Adapters CARex-AntP eine Verbesserung der Transduktionsleistung gegenüber einer adapterfreien Infektion erreicht werden. Die übrigen getesteten Adapter waren unwirksam.

Es zeigt Fig. 6 einen weiteren Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter. Rekombinante, lösliche Adapterproteine bestehend aus der gesamten Ektodomäne von hCAR und basischen Domänen abgeleitet von Tat, VP22 und AntP ermöglichen die
5 adenovirale Infektion von CAR-defizienten SKLU-1-Zellen. Zum Ermitteln dieses Befundes wurden 293-Zellen mit den Expressionsvektoren für Adapterproteine und Kontrollproteinen wie in der Legende angezeigt transfiziert. Proben von Gesamtzellextrakten (oben) und entsprechenden Mediumüberständen (unten) der Produktionszellen wurden auf
10 Adapterexpression durch Western Blot analysiert. Wie die Überstandsanalyse zeigt (Teilfigur A), ist CARex-9xArg nicht im Überstand nachweisbar, im Gegensatz zu CARex-Tat bzw. -VP22 und -AntP.

Teilfigur B zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der SKLU-1 Zellen mit äquivalenten Volumina an Überständen von Adapter-exprimierenden 293-
15 Zellen (vgl. entsprechende Beschreibung zu Fig. 5) behandelt wurden. AdLacZ wurde in einer MOI von 10 zugegeben und die Infektion wurde für 4 Stunden durchgeführt. Nach 48 h wurden infizierte Zellen durch X-gal-Färbung nachgewiesen. CARex-VP22 bzw. -Tat ermöglichten eine effiziente adenovirale Infektion dieser CAR-defizienten Zelllinie. Im Falle von CARex-
20 AntP war lediglich eine schwache Erhöhung zu beobachten. Alle anderen Kontrollproteine führten zu keiner Infektion der Zellen analog zur Negativkontrolle mit Überständen von pBluescript-transfizierten Produktionszellen.

Figur 7 zeigt einen Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener
25 erfindungsgemäßer Adapter gegenüber Tumorzellen epithelialen Ursprungs. In einer Untersuchung, deren Ergebnisse in Teilfigur A dargestellt sind, wurden verschiedene Zielzelltypen mit CARex-VP22 bzw. CARex-Tat-haltigem Medium bei einer Adapter-Konzentration von final 2 nM versehen. Sofort wurde AdLacZ (MOI 10) zugegeben und die Infektion wurde 4 h lang
30 durchgeführt. Nach 48 h weiterer Inkubation wurde die Infektionseffizienz mittels X-gal-Färbung abgeschätzt. Es ist zu erkennen, dass die

Transduktionsleistung bei Adapter-unterstützten Infektionen im Schnitt zumindest 20fach höher ist als in der jeweiligen Adapter-freien Kontrolle.

Teilfigur B zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der 1 µg rekombinantes CARex-VP22 bzw. CARex-Tat (entspricht etwa 4 nM bzw. 8 nM) in Medium verdünnt wurde, mit Ad-GFP (MOI 30) versetzt und zu den angegebenen Zielzellen gegeben wurde. Die Infektion erfolgte 4 h lang. Nach 48 h Inkubation wurde die Fluoreszenz durch Mikroskopie beobachtet und die Infektionseffizienz mittels FACS-Analyse ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass die genannten Adapter nicht- oder schwachpermissive Zellen in geringer Konzentration mit bis zu 100%-Effizienz infizieren.

In Fig. 8 ist ein Vergleich der Transduktionsleistung verschiedener erfindungsgemäßer Adapter gegenüber Zellen nicht-epithelialen Ursprungs gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Applikation von CARex-VP22 bzw. -Tat die adenovirale Infektion auch in Zellen nicht-epithelialen Ursprungs (z.B. in Immunzellen und Zellen aus dem Nervensystem) verstärkt.

Teilfigur A zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der RAW264.7 Makrophagen und P388D.1 Monozyten-Makrophagen mit einem Medium enthaltend 2 nM rekombinantem CARex-VP22 oder CARex-Tat sowie AdLacZ (MOI 10, 4 h Infektionszeit) behandelt wurden. Die Infektionseffizienz wurde mittels β-Gal-Assay und X-gal-Färbung bestimmt. Es ist zu erkennen, dass durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Adapter die Transduktionseffizienz zumindest um das 25fache gesteigert werden konnte.

In der zur Teilfigur B führenden Untersuchung wurde AdGFP (MOI 30) mit CARex-VP22 oder CARex-Tat (4 bzw. 8 nM finaler Konzentration) zu RAW264.7 und p388D.1 Zielzellen zugegeben. Die Infektionseffizienz wurde durch Fluoreszenzmikroskopie und FACS bestimmt. Man erkennt, dass bei Verwendung erfindungsgemäßer Adapter 88% und mehr Zellen der Zellkultur transduziert wurden, während in einer Adapter-freien Kontrolle lediglich 1% der Zellen transduziert wurden.

Teilfigur C zeigt die Ergebnisse einer Untersuchung, bei der AdLacZ behandelt mit 2 nM CARex-VP22 bzw. CARex-Tat zu DC2.4 dendritischen Zellen bei einer MOI 10 bzw. 50 und einer Infektionszeit von 30 min zugegeben wurde. Die Quantifizierung erfolgte durch β -Gal-Assay und FACS-
5 Analyse (AdGFP wurde vergleichbar angewendet). Wieder ist zu erkennen dass bei Verwendung erfindungsgemäßer Adapter zumindest 5fach bessere Expressionsleistungen im Vergleich zu einer Kontrolle erzielt werden konnten.

Zur Teilfigur D: Immortalisierte Schwannzellen (ISC) wurden wie in (A) beschrieben behandelt. Der Grad der Infektion wurde durch X-Gal-Färbung
10 visualisiert. Man erkennt, dass bei Verwendung erfindungsgemäßer Adapter eine weitgehende Transfektion der verwendeten Zellkultur erreicht werden konnte.

Es zeigt Fig. 9 Ergebnisse einer Untersuchung zum Nachweisen der Möglichkeit, konditionell replizierende Viren zur Transduktion entsprechender
15 Zellen zu verwenden. Der Figur kann entnommen werden, dass CARex-VP22 bzw. -Tat vermittelte Rezeptor-unabhängige Infektion die virale Lyse von Tumorzellen durch Konditionell-replizierende und konstitutiv-replizierende Adenovirusvektoren verstärkt. Tumorzellschichten wurden mit hTert-Ad (konditionell replizierender Vektor), Ad-wt (konstitutiv-replizierender Vektor)
20 und AdGFP (nichtreplizierende Kontrolle) infiziert, wobei eine MOI wie in der Legende beschrieben angewendet wurde. Zudem wurden die Zellen mit den nichtreplikativen Expressionsvektoren AdCARex-VP22, AdCARex-Tat und AdGFP (Kontrolle) bei einer MOI von 25 (gültig für gering permissive Zellen SAOS-2, HT1080 and MCF-7, wie in A zu sehen) oder bei einer MOI von 2
25 (gültig für permissive Zelllinien Huh7 und HepG2, siehe B) behandelt. Nach 6 Tagen Replikation wurde die Zellschichtzerstörung infolge viraler Replikation und Lyse durch Kristallviolett-Färbung visualisiert.

Figur 10 zeigt Ergebnisse einer Untersuchung zum Bestimmen der Dauerhaftigkeit einer Beladung von Adenoviren mit verschiedenen
30 erfindungsgemäßen Adaptern. AdGFP wurde gegen DMEM dialysiert und mit

rekombinantem CAREx-VP22 oder CAREx-Tat in 10fach molarem Überschuß entsprechend der angebotenen Adenovirus-Fiberknobmoleküle von AdGFP behandelt. Als Kontrolle diente unbehandelter AdGFP. Die auf diese Weise behandelten Viruspräparation wurden auf einen CsCl Dichtegradienten geladen und ultrazentrifugiert um den Proteinüberschuß abzutrennen. Die beobachtete Virusbande wurde aus dem Gradienten extrahiert, gegen DMEM dialysiert und mittels OD260-Bestimmung quantifiziert. Anschließend wurden SKLU-1 Zellen 4 h lang bei einer MOI von 50 infiziert. Eine hohe Infektionsrate konnte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass CAREx-VP22 bzw. -Tat stabile Komplexe mit adenoviralen Vektoren formen.

In Fig. 11 ist ein Vergleich des Einflusses des pH-Wertes des Kultivierungsmediums auf die Transduktionseffizienz verschiedener, teilweise erfindungsgemäßer Adapter gezeigt. Adapterproteine wurden wie zu Fig. 5 beschrieben hergestellt und der pH-Wert der entsprechenden Überstände auf einen Wert von 4.8 bis 7.3 eingestellt. Die Überstände wurden dann mit jeweils gleichen Konzentrationen an Ad-LacZ vermischt und verwendet zum Infizieren von NIH3T3-Zellen (30 min Exposition der Zellen mit den virushaltigen Überständen, anschließendes Austauschen des Mediums gegen ein Kultivierungsmedium). Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Infektionseffizienz durch β -Galactosidase-Assays von Lysaten ganzer Zellen untersucht. Man erkennt, dass eine höhere β -Galactosidase-Expression bei niedrigeren pH-Werten erreicht wird. Dies lässt den Schluss zu, dass die erfindungsgemäßen Adapter vorteilhafterweise geeignet sind, die Transfektion von Zellen auch innerhalb von Tumorknoten zu verbessern, in denen üblicherweise ein eher saures Milieu vorherrscht.

Figur 12 ist eine Darstellung des Einflusses einer gegenüber der Verabreichung eines erfindungsgemäßen Adapters verzögerten Verabreichung einer anzukoppelnden Substanz an verschiedene Zielzellen. CAREx-VP22 wurde wie zu Fig. 5 beschrieben hergestellt. Der adapterhaltige Überstand wurde zu Kulturen von Zielzellen (SAOS-2 und SKLU-1) gegeben. Nach der an der X-Achse angegebenen Zeit wurde Ad-LacZ zugegeben. Die

Zellkulturen wurden dann 30 min lang inkubiert, anschließend wurde das Medium wie üblich gegen ein virus- und adapterfreies Kultivierungsmedium ausgetauscht. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die Infektionseffizienz durch β -Galactosidase-Assays von Lysaten ganzer Zellen untersucht. Man erkennt, dass die β -Galactosidase-Expression von SKLU-1-Zellen bei einer um ca. 30 min verzögerten Adenoviruszugabe in etwa halbiert ist, bei SAOS-2-Zellen tritt diese Halbierung erst nach mehr als 1,5 h verzögerter Adenoviruszugabe auf. Der erfindungsgemäße CARex-VP22-Adapter bleibt entsprechend lange im Kultivierungsmedium für eine Ankopplung des Adenovirus an die Zelloberfläche verfügbar.

Beispiel 1: Herstellung der Polynucleotide

Die für die Generierung eines CAR₁₋₂₃₅-VP22-Fusionsproteins (ein erfindungsgemäßer Adapter) notwendige cDNA wurde mittels PCR generiert. Als Template diente die im Plasmid LXS_N-hCAR (freundliche Überlassung von Dr. DeGregori, Denver, USA) enthaltene cDNA des humanen Coxsackievirus und Adenovirusrezeptors (hCAR). Als 5'-Primer wurde das Oligonukleotid 5'-GTGGTACC **ATG GCG CTC CTG CTG TGC TTC GTG C-3'** (Kpn I-Schnittstelle kursiv, natürliches Startcodon von hCAR in Fettdruck) und als 3'-Primer das Oligonukleotid 5'-TAGCGGCCGCC **TTT ATT TGA AGG** **AGG GAC AAC GTT TAG ACG C-3'** verwendet (Not I-Schnittstelle kursiv, Komplementäre der Basen 776 bis 807 von hCAR (Entrez Pubmet Accession No.: NM 001338) in Fettdruck). Das entstehende Fragment enthält die Leadersequenz von hCAR sowie dessen Extrazellulardomäne. In der PCR wurden 5 Zyklen bei 49°C und 30 Zyklen bei 55°C unter Verwendung von Pfu Polymerase durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und die Enden durch Verdau mit Kpn I und Not I regeneriert. Dieses Fragment wurde anschließend in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vektors pVP22mycHis 2 (Invitrogen) eingefügt, resultierend in das Plasmid pCAR(ex)-VP22. Die Plasmide für Fusionsproteine der Extrazellulardomäne von hCAR mit den

Zelladhäsionsdomänen von HIV-TAT, AntP bzw. einer 9 x Argininsequenz (9xArg) wurden wie folgt kloniert:

Zur Generierung von pCAR(ex)-TAT₄₈₋₅₇ wurden das Oligonukleotid 5' AAAGC GGC CGC GGA GGA GGA AGT GGA GGA GGA GGA **GGC AGG AAG AAG**
5 **CGG AGA CAG CGA CGA AGA** GGT CTA GAAA-3' (sense-Oligonukleotid, Fettdruck entspricht den Basen 5518-5547 des HIV-Genoms, Accession No.: NC 001802, kodierend für die Aminosäuren 48-57 (Sequenz: GRKKRRQRRR) des TAT-Proteins, Schnittstellen für Not I und Xba I kursiv) und ein
entsprechend komplementäres antisense Oligonukleotid (5'-
10 TTTCTAGACCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCCTGCCTCCTCCTCCT
CCTTCCTCCTCCGCGGCCGCTTT-3') hybridisiert, mit Not I und Xba I
verdaut und in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pCAR(ex)-
VP22 eingefügt. Dieses wurde zuvor mit den Restriktionsenzymen Not I und
Xba I geschnitten und die für VP22 kodierende cDNA durch
15 Agarosegelelektrophorese abgetrennt.

Die Generierung der AntP und 9xArg Varianten erfolgte durch vergleichbare Arbeitsschritte.

Als für 9xArg kodierende DNA wurde das Oligonukleotid 5'AAAGC GGC CGC
GGA GGA GGA AGT GGA GGA GGA GGA **CGT CGC CGA CGG AGA AGG**
20 **AGA CGT AGA** GGT CTA GAAA-3' (sense-Oligonukleotid, Fettdruck
entspricht der für die Aminosäuresequenz RRRRRRRRR kodierenden DNA,
Schnittstellen für Not I und Xba I kursiv) sowie ein entsprechend
komplementäres antisense Oligonukleotid verwendet
(5'-TTTCTAGACCTCTACGTCTCCTTCTCCGTCGGCGACGTCCTCCTCCTC
25 CACTTCCTCCTCCGCGGCCGCTTT-3'. Name des resultierenden Plasmids:
pCAR(ex)-9xArg.

Als für AntP kodierende DNA wurde das Oligonukleotid 5'AAGC GGC CGC
GGA GGA GGA GGA **AGA CAG ATC AAA ATA TGG TTC CAA AAC CGG**
CGC ATG AAA TGG AAG AAA GGT CTA GAAA-3' (sense-Oligonukleotid,

Fettdruck entspricht den Basen 184-231 der partialen cds für Euprymna scolopes antennapedia homeodomain protein, Accession No.: AY052758, kodierend für die Aminosäuren 62-77, Sequenz: RQIKIWFQNRRMKWKK, Schnittstellen für Not I und Xba I kursiv) sowie ein entsprechend
5 komplementäres antisense Oligonukleotid verwendet
(5'-TTTCTAGACCTTTCTTCCATTTTCATGCGCCGGTTTTGGAACCATATTTT
GATCTGTCTTCCTCCTCCTCCGCGGCCGCTT-3'. Name des resultierenden
Plasmids: pCAR(ex)-AntP₆₂₋₇₇.

10 Alle verwendeten Oligonukleotide verfügen in 5'-Richtung der Zelladhäsions-
domäne noch über mehrere Glycin/Serinreste, um diese Domäne von der
CAR-Domäne räumlich zu trennen.

Die oben genannten Plasmide wurden sequenziert und mit dem Qiagen
Endofree Plasmid Maxi Prep Kit präpariert. Die Produktion analytischer
Mengen von CAR-Fusionsproteinen erfolgte durch Transfektion von 293-
15 Zellen mit der Kalziumpräzipitationsmethode bzw. Liposomenbildnern. 24-48 h
nach der Transfektion konnten die in den Zellkulturüberständen enthaltenen
Fusionsproteine für analytische Zwecke weiterverwendet werden.

20 Beispiel 2: Herstellung der für CAR(ex)-Fusionsproteine kodierenden
Adenoviren für die präparative Proteinproduktion aus infizierten
Zellkulturen

Die Generierung des Adenovirus, der eine Expressionseinheit für CAR₁₋₂₃₅-
VP22 enthält, erfolgte mit Hilfe des Klonierungssystems nach Mizuguchi und
Kay (Hum. Gene Ther.1998, 9(17): 2577-83). Als Ausgangspunkt für den
Shuttlevektor wurde eine modifizierte Variante des Vektors pHM3 verwendet
25 (pHM3/pBK-CMV), der in der MCS von pHM3 die komplette Expressions-
kassette (CMV-Promoter/MCS/SV40-Polyadenylierungssignal) des Vektors
pBK-CMV (Stratagene) enthält. Die cDNA für CAR₁₋₂₃₅-VP22 wurde aus dem
Plasmid pCAR(ex)-VP22 durch Hind III Verdau, Behandlung mit Klenow-
Fragment und anschließend Pme I Verdau präpariert und in die Sma I

- Schnittstelle des Vektors pHM3/pBK-CMV eingefügt. Die korrekte Orientierung des resultierenden Konstruktes (p4622) wurde durch Kpn I Verdau überprüft. Die Klonierung des adenoviralen Plasmids erfolgte durch Isolierung des PI-Sce/I-Ceu Fragmentes aus p4622 und dessen Ligation in die entsprechenden
- 5 Schnittstellen des adenoviralen Vektors pAdHM4. Die Ligation resultierte in das Konstrukt pAd4679. Mit einer Pac I linearisierten Präparation dieses Vektors wurden 293-Zellen transfiziert, um infektiöse Partikel zu generieren. Nach Auftreten eines cytopathischen Effektes wurden die Zellen geerntet und die infektiösen Partikel durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen freigesetzt.
- 10 Der Zelldetritus wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Herstellung höhertitriger Viruspräparationen eingesetzt (Bezeichnung des gewonnenen Adenovirus: Ad4679). Die Gewinnung von höheren Titern rekombinanter Viren erfolgte ebenfalls in 293 Zellen und der anschließenden Aufreinigung virushaltiger Lysate über CsCl-Gradienten-Ultrazentrifugation.
- 15 Die Generierung des Adenovirus mit einer Expressionskassette für CAR₁₋₂₃₅-TAT₄₈₋₅₇ erfolgte mit Hilfe des Rekombinationssystems von He und Vogelstein (He et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 2509-2514). Die für CAR₁₋₂₃₅-TAT₄₈₋₅₇ kodierende cDNA wurde aus dem Plasmid pCAR(ex)-TAT durch Hind III und Pme I Verdau isoliert und in die Hind III und EcoR V Schnittstellen des
- 20 Vektors pShuttle-CMV ligiert. Die Ligation resultierte in das Konstrukt p4923. Das Konstrukt p4923 wurde mit Pme I linearisiert und anschließend mit dem adenoviralen Vektor AdEasy 1 gemischt. Mit diesem Ansatz wurden rekombinationsfähige BJ5183 E. coli elektroporiert. Das hierdurch generierte rekombinante Adenovirusplasmid wurde als p5091 bezeichnet. Mit einer Pac I
- 25 verdauten Präparation dieses Vektors wurden 293-Zellen transfiziert, um infektiöse Partikel zu generieren. Nach Auftreten eines cytopathischen Effektes wurden die Zellen geerntet und die infektiösen Partikel durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen freigesetzt. Der Zelldetritus wurde abzentrifugiert und der Überstand zur Herstellung höhertitriger
- 30 Viruspräparationen eingesetzt (Bezeichnung des gewonnenen Adenovirus: Ad5091).

Beispiel 3: Herstellung der rekombinanten CAR-Fusionsproteine aus den
Überständen adenoviral infizierter Zellen

Die rekombinanten CAR(ex)-Fusionsproteine verfügen an ihrem C-Terminus über ein 6 x Histidin Motiv, welches positiv geladene Ni-Ionen zu komplexieren
5 vermag. Auf diese Weise können die Fusionsproteine mit Hilfe von festphasengebundenen Nickelionen aus komplexen Proteinmischungen aufgereinigt werden.

Die zuvor beschriebenen Adenoviren Ad4679 und Ad5091 wurden als Vektoren für die Produktion der CAR-Fusionsproteine in infizierten Wirtszellen
10 verwendet.

Als Zelllinien für die Produktion der rekombinanten Proteine eignen sich prinzipiell alle adhärenenten, adenoviral infizierbaren Zelltypen, wie z. B. COS-1, HepG2, Huh 7 etc. Infizierte COS-1 Zellen lieferten hohe Mengen an aktiven CAR-Fusionsproteinen im Überstand und wurden daher bevorzugt eingesetzt.
15 COS-1 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% mit Ad4679 bzw. Ad5091 mit einer MOI von 10-50 in DMEM (mit 2 % fötalem Kälberserum supplementiert) infiziert und 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurden die infizierten Zellkulturen mit 1/10 Vol. 10x Auftragspuffer (500 mM NaH₂PO₄, 3 M NaCl, 100 mM Imidazol) versetzt und 1 min weiter im
20 Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand für die nachfolgende säulenchromatographische Aufreinigung abgenommen (die infizierten Zellen wurden für eine weitere Inkubationsperiode mit Medium versetzt und wieder 48 h inkubiert). Die gewonnenen Überstände wurden gesammelt, eventuell verschleppte Zellen durch eine 10minütige
25 Zentrifugation bei 1000 x g und eine Sterilfiltration mit einem 0,22 µm Filter abgetrennt. Danach wurde die Säulenchromatographie durchgeführt. Hierzu wurde Ni-NTA-Agarose (Qiagen) mit Auftragspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) äquilibriert und die oben beschriebenen Zellkulturüberstände aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit
30 Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) gewaschen.

Die Elution der CAR-Fusionsproteine erfolgte mit Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 50 mM L-Histidin). Die Konzentration und Funktion der CAR-Fusionsproteine im Eluat wurde durch BioRad Protein Assay, SDS-Gelelektrophorese mit Sypro-Orange Färbung sowie Infektionsexperimente ermittelt. Ausreichend konzentrierte Eluate wurden gegen 25 % Glycerol in DMEM-Medium dialysiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 80°C gelagert.

Nachfolgend wird die Bestimmung der Relation von anzuwendendem Adapterprotein zu virusassoziiertem Fiberknobmenge beschrieben.

Die Viruskonzentration wird mit gängigen Titrierungsmethoden ermittelt. Dies erfolgt z. B. spektrophotometrisch durch Messung der OD_{260} zur Ermittlung der Gesamtkonzentration an viralen Partikeln, wobei $1 \text{ OD} = 1 \times 10^{12}$ Adenoviruspartikeln/ml entspricht. Die infektiöse Partikelkonzentration kann durch Plaque Assay, Rapid Titer Assay (Fa. BD Biosciences) bzw. durch limitierende Verdünnung und nachfolgende statistische Berechnung ermittelt werden.

Die Ermittlung der Adapterproteinkonzentration in affinitätschromatographischen Präparationen erfolgt durch konventionelle Proteinbestimmungsmethoden (BioRad Protein Microassay, Lowry u.a., $\text{OD}_{230/260}$) unter Berücksichtigung eines Molekulargewichtes für CARex-VP22 von ca. 68 kD und für CARex-Tat von ca. 38 kD. Die nachfolgenden Berechnungen basieren vereinfachend auf der Annahme von 100 % intaktem Fiberknob-Protein im Adenovirus.

Ca. 250 ng CAR-Tat bzw. 500 ng CAR-VP22 (im nachfolgenden Ansatz entsprechend einer Konzentration von ca. 2 nM) sind ausreichend für die Vermittlung einer nahezu 100 %igen Infektion von 1×10^6 nichtpermissiven Zielzellen (z. B. SKLU-1 oder NIH3T3) mit Ad-LacZ bei einer MOI (multiplicity of infection) von 25 in einem Infektionsvolumen von 3 ml.

Bei einer MOI von 25 entspricht dies einer Anzahl von $2,5 \times 10^7$ infektiösen Partikeln. Da gewöhnlich bei AdLacZ-Präparationen ca. jeder zehnte Partikel infektiös ist, entspricht dies einer Gesamtpartikelzahl von $2,5 \times 10^8$. Da adenovirale Partikel über jeweils 12 Fiberknobmoleküle verfügen, entspricht dies einer Fiberknobkonzentration von $1 \times 10^9/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^{12}/\text{l}$. Das Adapterprotein wird bei einer Konzentration von 2 nM, d.h. mit $1,2 \times 10^{15}/\text{l}$ eingesetzt. Ein empfehlenswertes molares Verhältnis von Adapterprotein (bei Annahme von 100 % funktionellem Protein) zur theoretischen Fiberknobanzahl beträgt daher insbesondere 1200. Der molare Überschuß von 1200 dient dem Ausgleich von Faktoren wie Dissoziationsgleichgewicht, Adapteraufnahme durch die Zielzellen und dem Anteil an nichtfunktionellem Adapterprotein. Bei geringeren Vorinkubationsvolumina bzw. Infektionsvolumina ist zu erwarten, dass auch ein geringerer Überschuß genügen wird, wie z. B. 100-150. Auch bei in vivo Infektionen (Maus, intravenöse Injektion in Schwanzvene) reicht diese Adapter/Fiberknobrelation bei Vorinkubation der benötigten Virusmenge (z. B. $1 \times 10^{10}/20 \text{ g Maus}$) mit der berechneten Adaptermenge in einem Injektionsvolumen von 300 μl . Zuvor kann die Menge an nichtgebundenem Adapter durch eine Dichtegradientenzentrifugation (CsCl-Gradient) abgetrennt werden.

Gratton erwähnt einen Konzentrationsbereich von 50 μM bis 5 mM in 100 μl Lösungsvolumen mit 1×10^6 infektiösen Partikeln des anzukoppelnden Adenovirus zur Erreichung einer signifikanten Transduktionsverbesserung.

Hier entsprechen 50 μM einem Absoluteinsatz an AntP von 5 nmol entsprechend einer Menge von 3×10^{15} AntP-Molekülen. Die Anzahl der Linkermoleküle (Fiberknob) ist hierbei $1,2 \times 10^8$, hierbei gegeben die Annahme, dass jeder 10. Partikel des eingesetzten Virus tatsächlich infektiös ist, und ein Adenovirupartikel 12 Fiberknobmoleküle besitzt. Die berechnete Relation von Adapter (AntP) zu Linker (Fiberknob) ist demzufolge $3 \times 10^{15} / 1,2 \times 10^8 = 2,5 \times 10^7$ bzw. analog berechnet für den gesamten bevorzugten Einsatzbereich nach Gratton von 50 μM – 5 mM: $2,5 \times 10^7$ – $2,5 \times 10^9$.

Patentansprüche

1. Adapter zum Ankoppeln einer an einer Zelloberfläche anzukoppelnden Substanz, umfassend:
 - 5 a) einen Abschnitt zum Erkennen der und Binden an die anzukoppelnde Substanz, und
 - b) einen rekombinanten Abschnitt zum Anordnen des Adapters an der Zelloberfläche mit einer Affinität für eine oder mehrere negativ geladene Zelloberflächenstrukturen.
- 10 2. Adapter nach Anspruch 1, umfassend einen Abschnitt zum Erkennen des und Binden an das adenovirale Fiberknob-Protein als Abschnitt a), wobei der Abschnitt einen Teil der extrazellulären Domäne des Coxsackie Adenovirus Rezeptors (CAR) oder einen funktionsgleichen Teil umfasst.
3. Adapter nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet,
15 dass der Abschnitt b) des Adapters ausgewählt ist aus:
 - einem Peptid von 6 oder mehr Aminosäuren Länge, von denen zumindest die Hälfte Guanidino- und/oder Amidinoseitenketten enthalten,
 - einem Oligopeptid mit zumindest 6 Argininseitenketten,
 - 20 - einem Peptid der Aminosäuresequenz entsprechend der basischen Region des HIV tat-Proteins,
 - der dritten Helix eines Homöobox-Proteins, und
 - einen die Verankerung an einer Zelloberfläche vermittelnden Abschnitt des Protein VP22 des Herpes simplex-Virus.
- 25 4. Adapter nach einem der vorherigen Ansprüche, ferner umfassend einen Oligomerisierungsabschnitt zum Bilden von Di-, Tri- und/oder Oligomeren des Adapters.

5. Adapter nach einem der vorherigen Ansprüche, ferner umfassend eine Leadersequenz, um die Synthese des Adapters in das raue endoplasmatische Retikulum zu bewirken.
6. Nucleinsäure mit einem Abschnitt, der für einen Adapter nach einem der
5 vorherigen Ansprüche codiert.
7. Virus zum Expressieren eines Adapters nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Virus in einem Stadium seiner Vermehrung eine Virus-Hülle besitzt, und wobei das Virus enthält:
 - eine Nucleinsäure gemäß Anspruch 6, und
 - 10 - einen Nucleinsäure-Abschnitt zur Expression eines Proteins der Virus-Hülle, an das der Abschnitt a) des Adapters ankoppeln kann.
8. Verwendung eines Adapters nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum nicht-therapeutischen Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz an eine Zelloberfläche.
- 15 9. Verfahren zum nicht-therapeutischen Ankoppeln einer Substanz an eine Zelloberfläche, umfassend die Schritte:
 - a) Exponieren der anzukoppelnden Substanz gegen einen Adapter nach einem der Ansprüche 1 bis 5, um die Substanz mit dem Adapter zu versehen, und
 - 20 b) Exponieren der Zelloberfläche gegen die mit dem Adapter versehene, anzukoppelnde Substanz.
10. Verwendung eines Adapters nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zum Herstellen eines Arzneimittels zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz an eine Zelloberfläche.

11. Verwendung eines Virus nach Anspruch 7 zum Herstellen eines Arzneimittels zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer Substanz an eine Zelloberfläche.

12. Arzneimittel zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns einer
5 Substanz an eine Zelloberfläche, umfassend

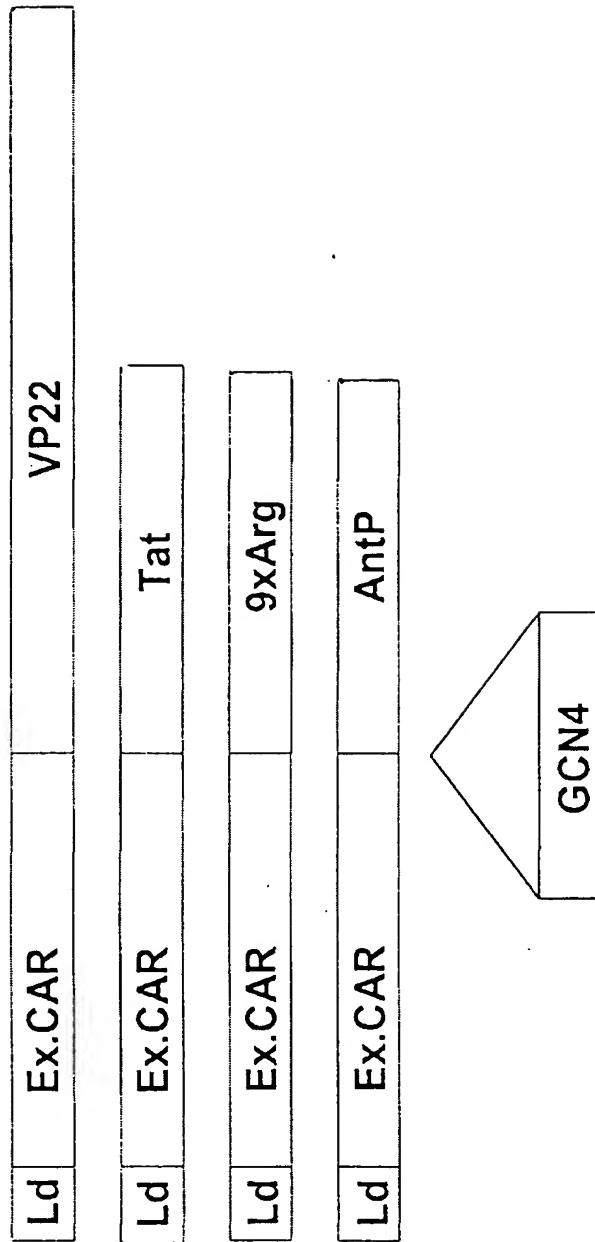
- einen Adapter nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder ein Virus nach Anspruch 7, und
- einen pharmazeutisch akzeptablen Träger.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Adapter zum Ankoppeln einer an einer Zelloberfläche anzukoppelnden Substanz. Insbesondere betrifft die Erfindung Adapter zum Ankoppeln eines adenoviralen Fiberknob-Proteins an eine Zelloberfläche, sowie für diese Adapter codierende Nucleinsäuren, Viren und Verfahren zu ihrer Verwendung. Die Erfindung betrifft auch Substanzen und Verfahren zum Vermitteln und/oder Verbessern des Ankoppelns von Substanzen wie Adenovirus-Partikel an eine Zelloberfläche, die wenig oder gar keinen Coxsackie Adenovirus-Rezeptor enthält.

Figur 1

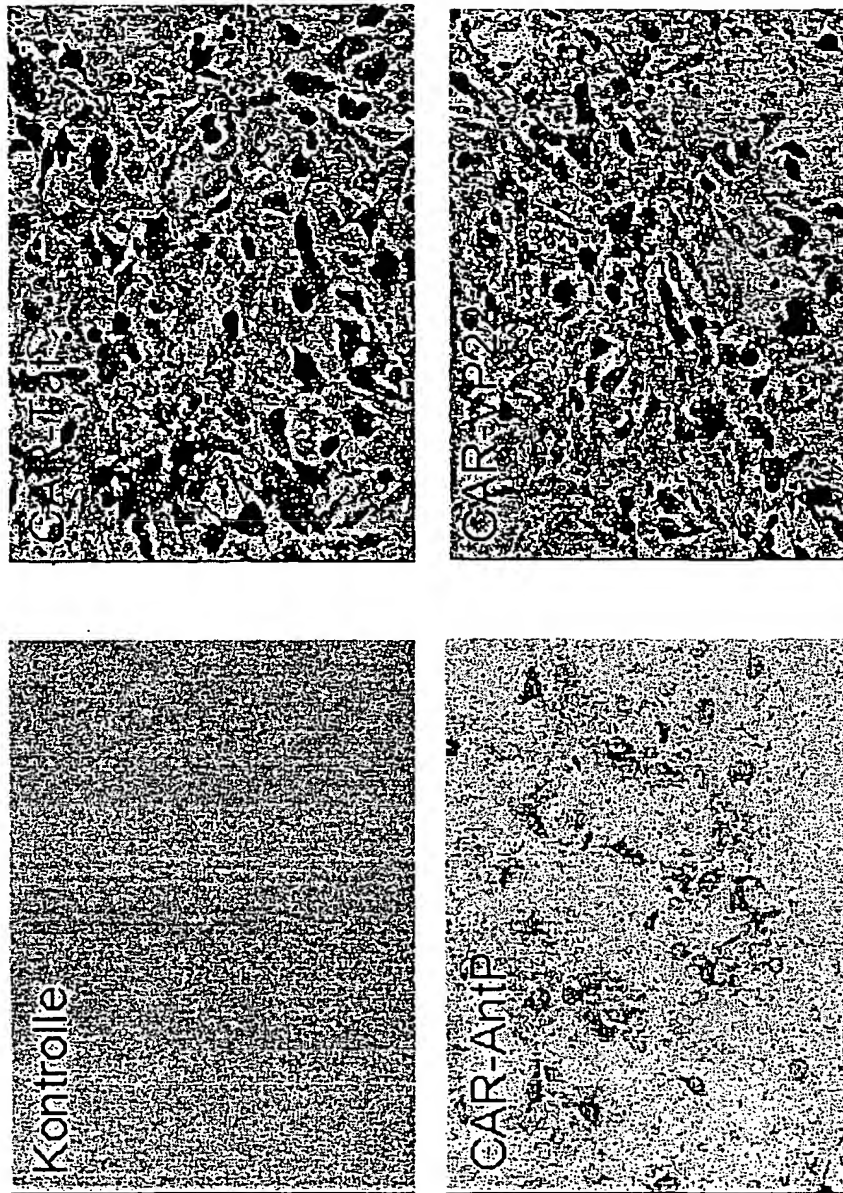
Schematischer Aufbau



Legende:

- Ld = natürliche Leadersequenz des Cocksackie Adenovirus Rezeptors für die Synthese des Proteins ins endoplasmatische Reticulum
- Ex.CAR = Extrazellulärdomäne des Cocksackie Adenovirus Rezeptors
- GCN4 = Optionale Insertion einer Oligomerisierungsdomäne (hier GCN4 als Beispiel) zur möglichen Verstärkung der CAR/Fiberknob-Affinität

Figur 2

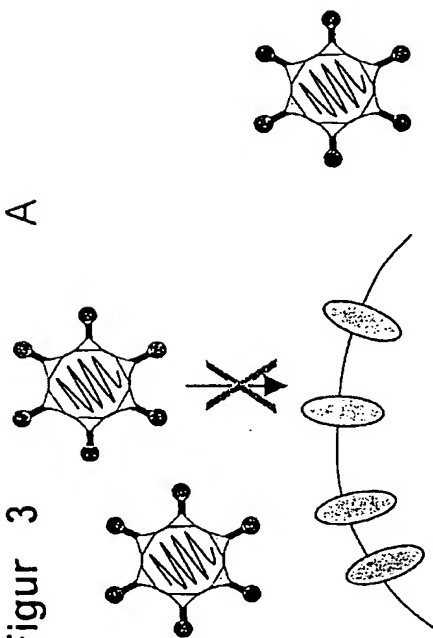


Fusionsproteine aus der extrazellulären Domäne des Coxsackie Adenovirus Rezeptors und basischen Peptiden bzw. VP22 erhöhen die adenovirale Infektion CAR-defizienter NIH3T3 Fibroblasten.

293 Zellen wurden mit Expressionskonstrukten für die in der Abbildung angegebenen Fusionsproteine transfiziert (Als Kontrolle pBluescript). Nach 36 h wurden die Überstände der Zellschichten abgenommen und mit LacZ-transgenen Adenoviren (Ad-LacZ) vermischelt. Danach wurden mit dieser Mischung NIH3T3 Fibroblasten infiziert. Die multiplicity of infection (MOI) betrug hierbei 10. Nach 48 h wurden die infizierten NIH3T3-Zellschichten per Blaufärbung durch X-gal Substratumsatz auf β -Galactosidaseexpression untersucht, um die virale Infektion nachzuweisen.

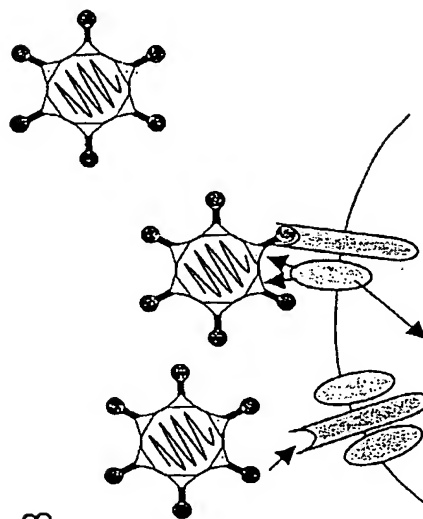
Figur 3

A



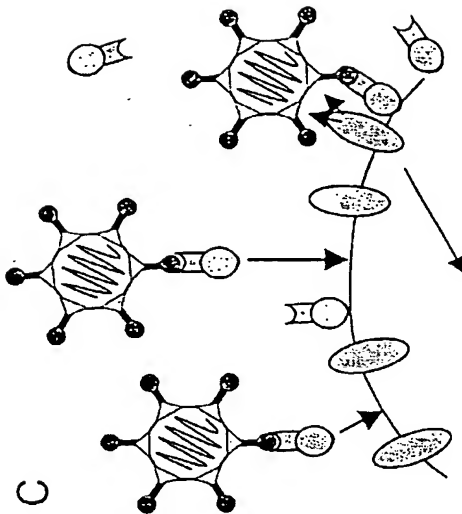
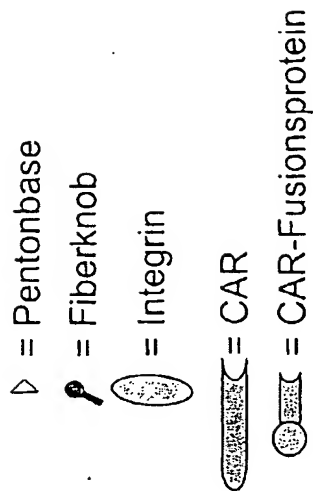
CAR-defiziente Zelle

B



CAR bindet das Hexonprotein des viralen Partikels, infolgedessen gibt Penton-gebundenes Integrin das Signal zur Internalisierung über Endozytose.

CAR-exprimierende Zelle



An das adenovirale Hexonprotein gebundenes CAR-Fusionsprotein dirigiert und heftet den Partikel an die Zellmembran. Infolgedessen binden Integrine an das adenovirale Pentonprotein als Signal für die Internalisierung des Partikels via Endozytose.

CAR-defiziente Zelle in Anwesenheit von CAR Fusionsproteinen

Figur 4

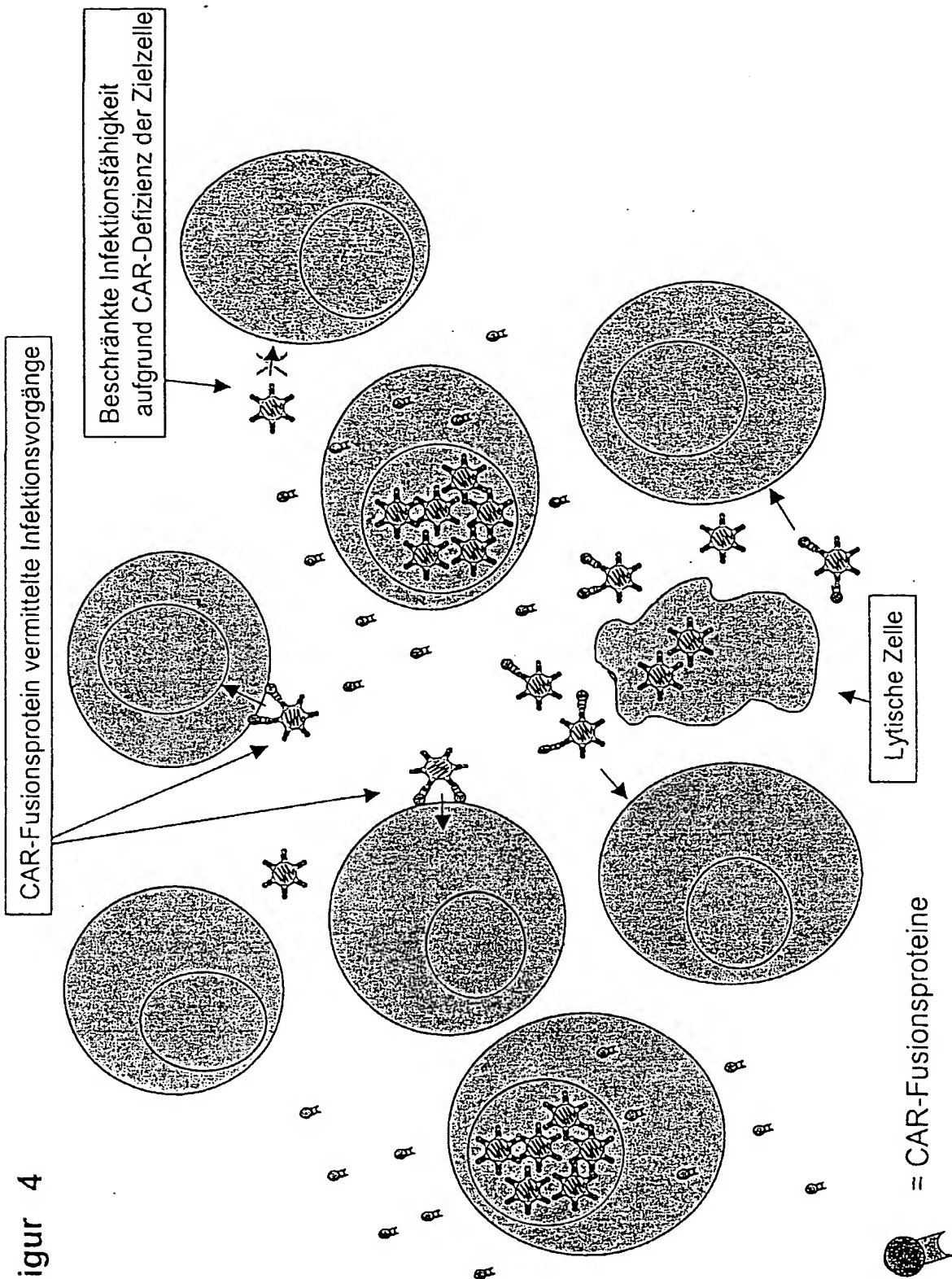
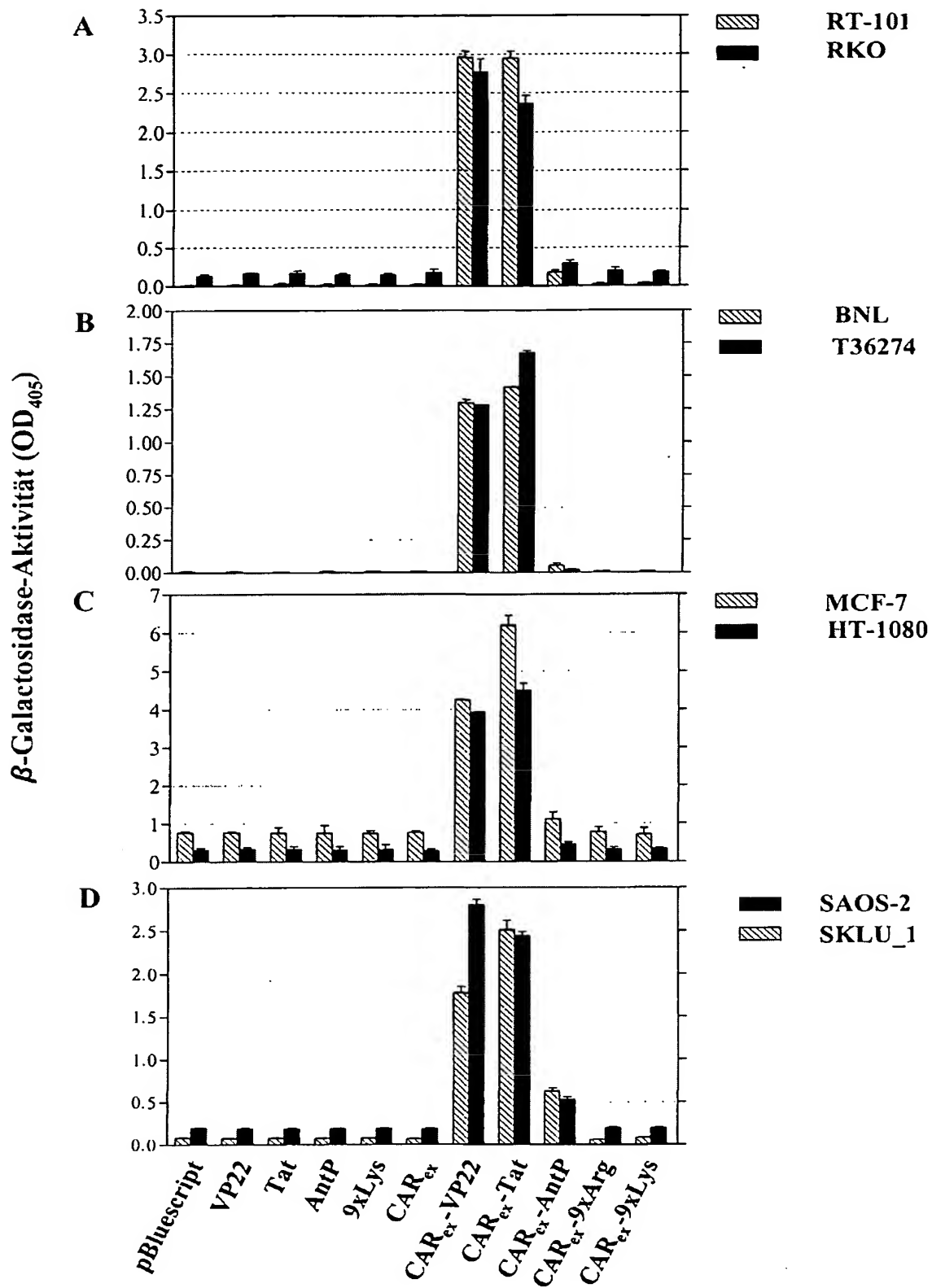


Fig. 5: Infektionseffizienz verschiedener Zelllinien



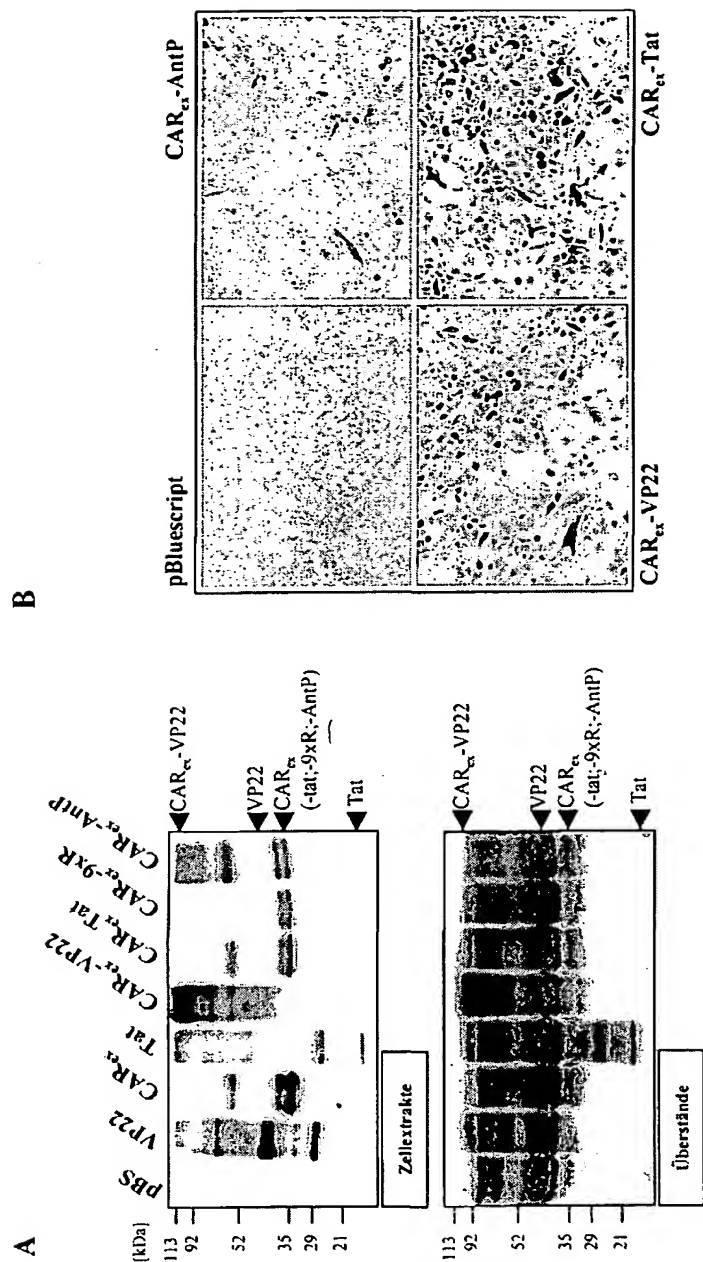


Fig. 6

A

| | AdLacZ (MOI 10; 4 h Infektion) | | |
|---------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | unbehand. Virus | + CAR _{ex} -Tat | + CAR _{ex} -VP22 |
| SAOS-2 | 0.5 - 2 | 45 - 55 | 50 - 65 |
| SKLU-1 | ~ 0 | 55 - 65 | 65 - 70 |
| MCF-7 | 2 - 3.5 | 40 - 50 | 50 - 60 |
| BNL | ~ 0 | 15 - 20 | 15 - 20 |
| H4IIE | 2 - 3 | 50 - 55 | 30 - 40 |
| HT1080 | 1 - 2 | 60 - 70 | 65 - 70 |
| RKO | 0.5 - 1.5 | 65 - 75 | 60 - 70 |
| RT101 | ~ 0 | 15 - 25 | 15 - 25 |
| T-36274 | ~ 0 | 35 - 45 | 35 - 40 |

durchschnittl. Transduktion (%)

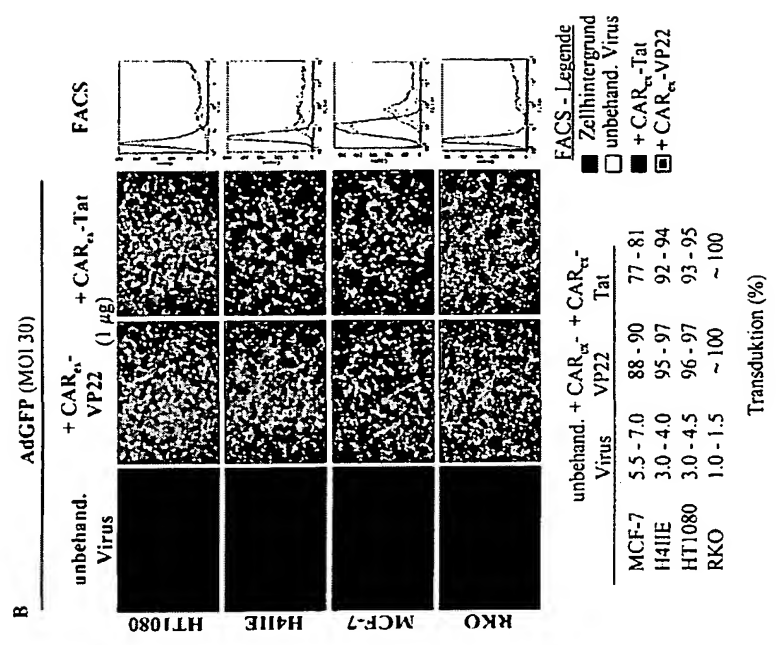


Fig. 7

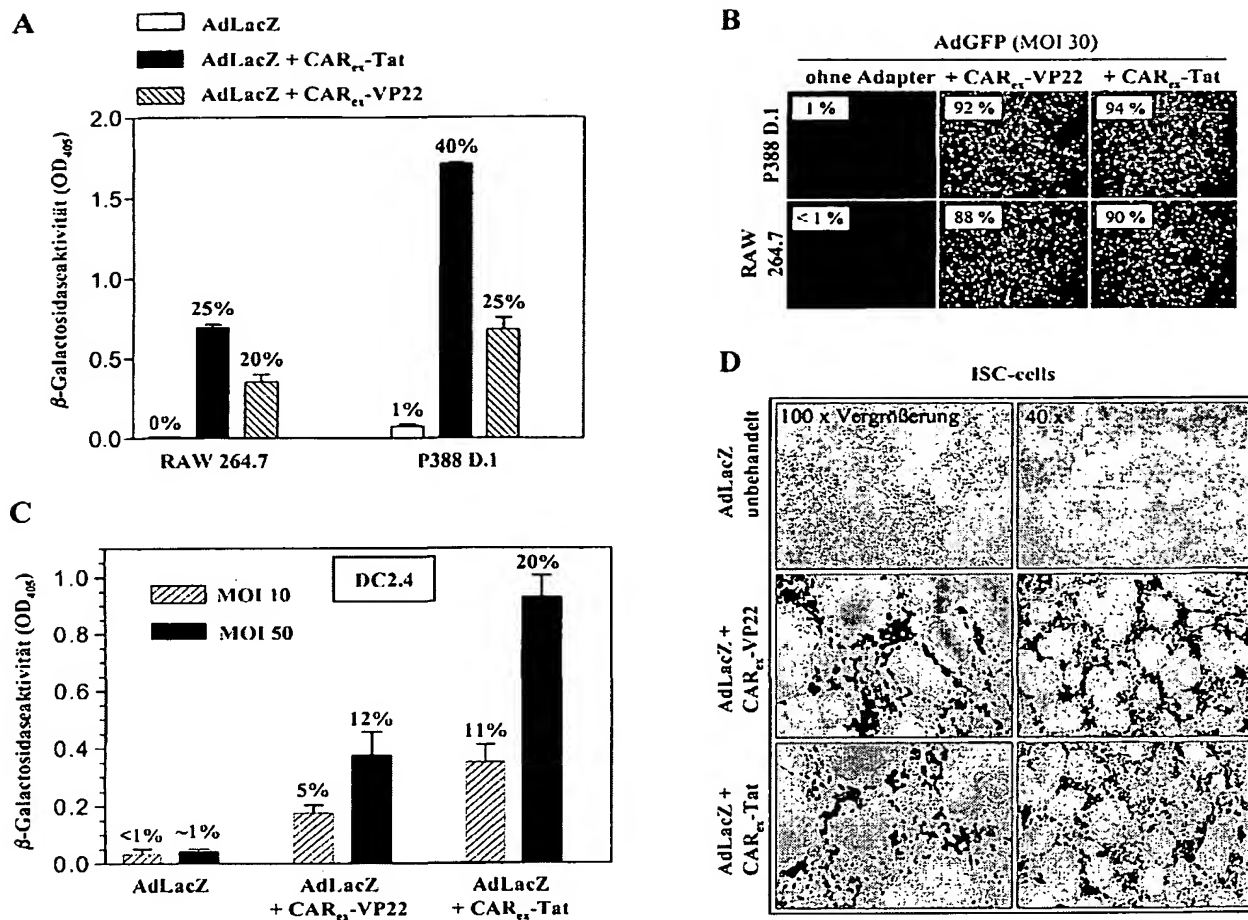


Fig. 8

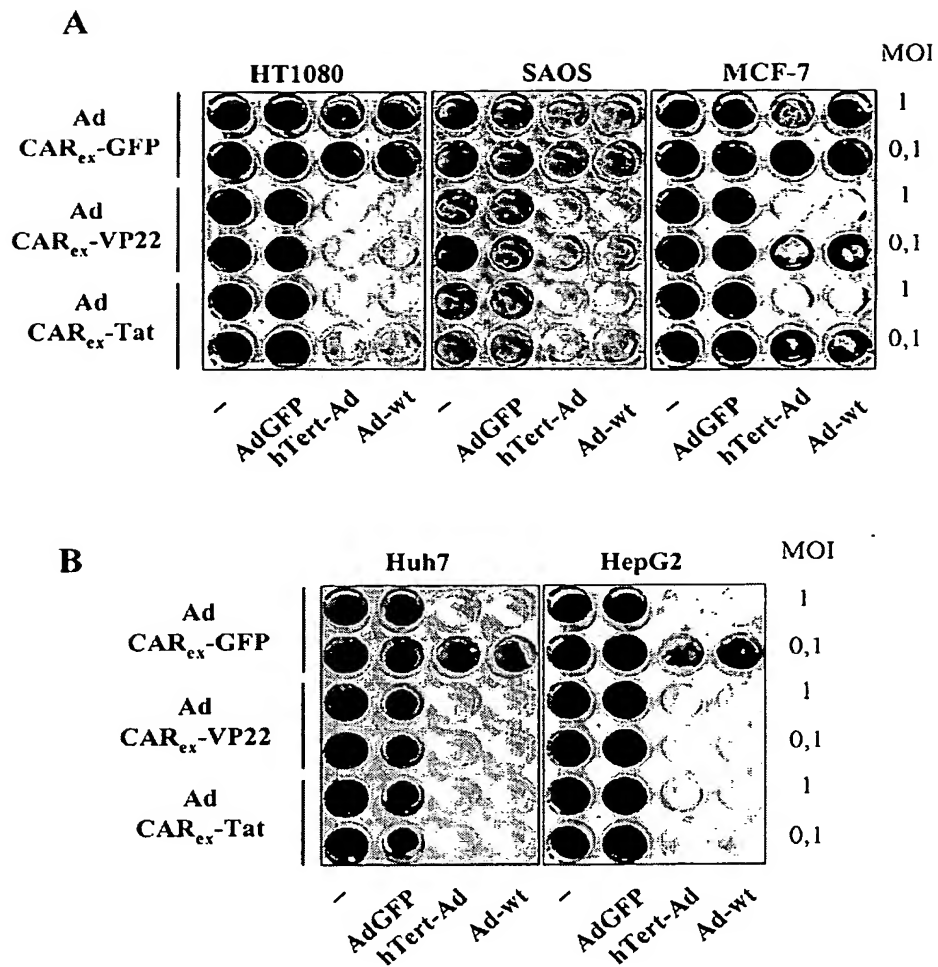


Fig. 9

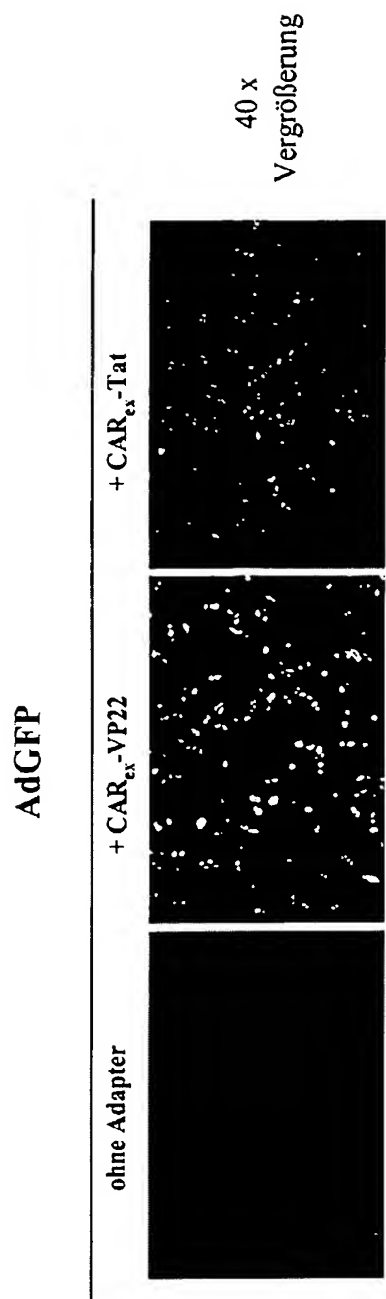


Fig. 10

Fig. 11: Einfluß des pH-Wertes

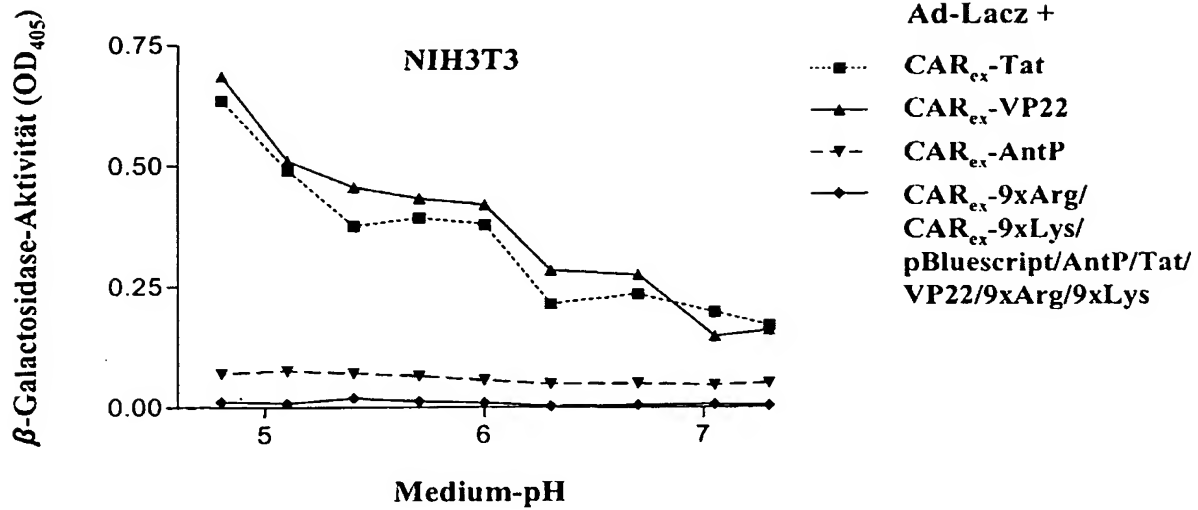


Fig. 12: Einfluß der Zeitverzögerung

